

THESIS / THÈSE

MASTER IN BIOLOGY OF ORGANISMS AND ECOLOGY

Impact des effluents de stations d'épuration sur le système reproducteur des poissons réponses morphologiques, histologiques et biochimiques

Doux fils, Jessica

Award date:
2005

Awarding institution:
University of Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**IMPACT DES EFFLUENTS DE STATIONS D'EPURATION SUR LE SYSTEME REPRODUCTEUR
DES POISSONS : REPONSES MORPHOLOGIQUES, HISTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Jessica DOUXFILS
Août 2005

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18. - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20.
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Impact des effluents de stations d'épuration sur le système reproducteur des poissons : Réponses morphologiques, histologiques et biochimiques

DOUXFILS Jessica

Résumé

Les perturbateurs endocriniens (EDCs) sont des composés connus pour les troubles qu'ils induisent, entre autres, chez les poissons. Les effluents de stations d'épuration (STEP) constituent par ailleurs une voie d'entrée ponctuelle de ces EDCs dans l'environnement aquatique. Dès lors, afin d'évaluer l'impact de tels rejets, quatre espèces sentinelles (goujon *Gobio gobio*, loche franche *Barbatula barbatula*, chabot *Cottus gobio* et ombre commun *Thymallus thymallus*) ont été prélevées dans la Vesdre, au cours de plusieurs campagnes de pêches, en « amont et en « aval » de deux STEP. Divers paramètres morphologiques, histologiques et biochimiques du système reproducteur ainsi que l'activité hépatique de détoxification EROD ont été analysés pour le goujon et la loche franche, seules espèces correctement représentées pour l'ensemble des sites. Dans l'ensemble, les résultats de notre étude ne révèlent pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les sites « amont » et « aval » pour aucune des espèces, campagnes et stations. Différentes hypothèses sont avancées pour expliquer l'absence de différences observée au sein des sites étudiés. Néanmoins, une constatation intéressante indique que les mâles de goujons présentent un taux plasmatique d'oestradiol aussi élevé que chez les femelles (goujons mâles : 4,33 ng/ml, goujons femelles : 4,95 ng/ml) pour la plupart des sites et des campagnes, induisant une accumulation anormale de vitellogénine chez les mâles. Une pollution oestrogénique globale de la Vesdre peut être une explication plausible car la VTG évolue parallèlement à l'E2, même si ce n'est pas le cas pour les loches mâles. Le goujon semble donc être l'espèce la plus sensible à l'état de pollution de la Vesdre.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 2005

Promoteur: P. Kestemont

TABLE DES MATIERES

Résumé

Remerciements

1. INTRODUCTION 1.

2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Contrôle endocrinien de la reproduction

2.1.1. Stéroïdogenèse et gamétogenèse 2.

2.1.1.1. *Chez la femelle : 17 β -oestradiol* 2.

2.1.1.2. *Chez le mâle : 11-kétotestostérone* 3.

2.1.2. Maturation finale 3.

2.1.2.1. *Chez la femelle* 3.

2.1.2.2. *Chez le mâle* 4.

2.1.3. Notion de pondeurs multiples et uniques 4.

2.2. Les perturbateurs endocriniens

2.2.1. Notion de perturbateur endocrinien 5.

2.2.2. Identification et source des principaux EDCs 5.

2.2.3. Composition des effluents de station d'épuration (STEP) 5.

2.2.4. Le devenir des EDCs dans l'environnement 7.

2.2.4.1. *La solubilité et l'adsorption : influence sur la biodisponibilité* 7.

2.2.4.2. *Dégradation environnementale et biotransformation* 7.

2.2.4.3. *Voie de pénétration dans l'organisme et absorption* 8.

2.2.4.4. *Bioaccumulation dans un organisme et dans la chaîne trophique* 9.

2.2.5. Effets des perturbateurs endocriniens 9.

2.2.5.1. *Introduction* 9.

2.2.5.2. *Réponses individuelles au niveau moléculaire, cellulaire et biochimique* 10.

2.2.5.3. *Réponses individuelles morphologiques et comportementales* 12.

2.2.5.4. *Réponses au niveau des populations* 14.

2.2.5.5. *Nature des effets : organisationnels ou activationnels* 15.

2.3. Notion de biomarqueur

2.3.1. Biomarqueur : signal précoce d'une perturbation écologique 15.

2.3.2. Définition du biomarqueur 15.

2.3.3. Fiabilité et limitation des biomarqueurs 16.

2.4. Sélection d'espèces sentinelles

2.4.1. Notion d'espèce sentinelle 17.

2.4.2. Ecologie des espèces étudiées 18.

2.4.2.1. *Le chabot* 18.

2.4.2.2. *Le goujon* 18.

2.4.2.3. *La loche franche - Barbatula barbatula (Linnaeus, 1758)* 19.

2.4.2.4. *L'ombre – Thymallus thymallus (Linnaeus, 1758)* 19.

2.5. Cours d'eau étudié

2.5.1. Evolution de l'état de la Vesdre jusqu'aujourd'hui	20.
2.5.1.1. <i>Origine de la pollution de la Vesdre</i>	20.
2.5.1.2. <i>Amélioration de la qualité de la Vesdre</i>	20.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Echantillonnage sur le terrain

3.1.1. Echantillonnage des communautés pisciaires	23.
3.1.2. Prélèvements du matériel biologique d'étude	23.

3.2. Méthodes d'analyses biochimiques

3.2.1. Dosage de l'activité EROD	24.
3.2.2. Dosage de la vitellogénine par la méthode de l'ALP	24.
3.2.3. Dosage de l'activité aromatase par radiométrie	25.
3.2.4. Dosage des stéroïdes sexuels plasmatiques	25.

3.3. Méthodes d'analyses histologiques

3.3.1. Manipulation des gonades	26.
3.3.2. Analyse des coupes histologiques	27.
3.3.2.1. <i>Histopathologie des testicules</i>	27.
3.3.2.2. <i>Histopathologie des ovaires</i>	28.
3.4. Analyses statistiques	28.

4. RESULTATS

4.1. Introduction

4.2. Paramètres morphologiques et histologiques

4.2.1. Rapport gonado-somatique ou RGS	30.
4.2.2. Histologie des gonades	32.
4.2.2.1. Maturation et croissance ovocytaire	32.
4.2.2.2. Proportion de follicules atrétiques pré-ovulatoires	34.
4.2.2.3. Histopathologie des testicules	34.

4.3. Paramètres biochimiques et endocriniens

4.3.1. Vitellogénine plasmatique	35.
4.3.2. Activité aromatase	36.
4.3.3. Stéroïdes sexuels plasmatiques	38.
4.3.4. Activité EROD	43.

5. DISCUSSION

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Par le développement des industries, de l'agriculture, de l'urbanisation ou du tourisme, les activités humaines constituent d'inévitables sources de perturbations de l'environnement, notamment des milieux aquatiques. Bien que l'eau soit une ressource essentielle à tout être vivant, elle est devenue un véritable « égout à ciel ouvert » suite aux multiples pollutions chimiques qui y aboutissent.

Depuis quelques décennies, l'intérêt scientifique se porte sur une catégorie particulière de composés chimiques présents dans l'environnement aquatique: les xénobiotiques. Parmi eux, les perturbateurs endocriniens constituent une classe de polluants particulièrement étudiée puisqu'ils représentent une menace non négligeable pour les organismes aquatiques et la santé humaine. En effet, ils sont capables d'altérer le bon fonctionnement du système endocrinien, ensemble de processus biologiques assurant la régulation de nombreuses réactions vitales au sein d'un organisme. Ces composés sont souvent associés aux rejets d'effluents provenant de stations d'épuration. Bien que leur fonction soit d'assainir les eaux usées, les STEP peuvent devenir une source ponctuelle de pollution lorsque les polluants de l'affluent à traiter sont incomplètement éliminés. Il n'est pas à exclure que les poissons vivant aux alentours de STEP soient en contact avec de tels composés et dès lors susceptibles de présenter des réponses à différents niveaux d'organisation biologique. Ces réponses peuvent alors être étudiées en tant que signal d'alarme d'une perturbation écologique et sont qualifiées de biomarqueurs.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'éventuel impact des rejets de STEP sur différentes espèces de poissons grâce à l'analyse de différents biomarqueurs morphologiques, histologiques, et biochimiques. Des pêches électriques ont été réalisées en amont et en aval direct des effluents de deux stations d'épuration (Wegnez et Goffontaine) situées sur le cours de la Vesdre. Cette rivière a subi de graves perturbations, mais recouvre progressivement sa qualité écologique suite, entre autres, à la mise en service de trois stations d'épuration (Membach, Wegnez et Goffontaine). Quatre espèces (goujon, loche franche, ombre commun et chabot commun) ont été échantillonnées dans le but de rechercher l'espèce sentinelle la plus adaptée à la détection des perturbateurs endocriniens. Ces espèces ont fait l'objet de divers prélèvements d'organes (foie, gonades) et de sang pour l'étude des divers paramètres biologiques étudiés : le Rapport Gonado-Somatique ou RGS, l'histopathologie des testicules, la maturation et croissance ovocytaire, le taux d'atrésie préovulatoire rencontrée chez les femelles, la vitellogénine plasmatique, l'activité aromatasase dans les gonades, les stéroïdes sexuels plasmatiques (oestradiol, testostérone et 11-kétotestostérone), ainsi que l'activité hépatique de détoxification EROD.

Le présent travail s'articule en quatre parties. La *première* consiste en une synthèse bibliographique permettant de visualiser l'ensemble des connaissances actuelles sur le contrôle endocrinien de la reproduction, les perturbateurs endocriniens, la notion de biomarqueur et d'espèce sentinelle ainsi que l'écologie générale des espèces étudiées. Enfin, nous décrivons l'évolution de l'état écologique de la Vesdre au cours du temps. La *deuxième* partie concerne le matériel et les méthodes utilisés lors de cette recherche. La *troisième* partie est consacrée aux résultats obtenus, ceux-ci étant ensuite interprétés au cours de la *quatrième* partie.

2.1. Contrôle endocrinien de la reproduction

2.1.1. Stéroïdogénèse et gamétogénèse

En région tempérée, la cyclicité saisonnière de la reproduction est importante pour s'assurer que la ponte coïncide avec :

- des conditions environnementales compatibles à la survie des œufs ;
- une quantité de nourriture suffisante pour la croissance des larves.

En conséquence, la maturation gonadale n'est généralement pas continue et nécessite une stimulation particulière à une ou plusieurs période(s) de l'année. Le développement gonadal dans les deux sexes est sous le contrôle d'une régulation endocrine intégrant les stimuli externes et impliquant les hormones hypothalamiques, hypophysaires et gonadales (figure 2.1.1).

En effet, en réponse à toute une série de facteurs environnementaux (température, photopériode, précipitations), le système nerveux central (SNC) stimule l'hypothalamus à sécréter de la Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) et cette première source de contrôle induit la production de Gonadotropines (GtH) par l'hypophyse (Pait et Nelson, 2002). Deux formes de GtH régulent la gamétogénèse chez le poisson : la GtHI (analogue à la FSH de mammifères) et la GtHII (analogue à la LH de mammifères). Avant la maturation, la GtHI favorise la synthèse des stéroïdes sexuels (androgènes, oestrogènes, progestagènes) qui, à leur tour, agissent sur des tissus cibles pour réguler la gamétogénèse, la reproduction, le phénotype sexuel et les aptitudes comportementales (Pait et Nelson, 2002). Grâce aux stéroïdes sexuels capables d'exercer une boucle de rétroaction (feed-back négatif), le cerveau reçoit des informations quant à l'état de développement des gonades. Cela lui permet de modifier, en conséquence, la production et la libération des différentes formes de GtH afin de poursuivre efficacement la croissance gonadique jusqu'à l'étape de maturation finale (Devlin et Nagahama, 2002). Comme chez les autres vertébrés, plusieurs enzymes sont responsables de la biosynthèse des stéroïdes sexuels (figure 2.1.2).

Bien que les oestrogènes soient généralement associés aux femelles, et les androgènes aux mâles, les deux sexes sont capables de produire et d'utiliser la plupart de ces stéroïdes (Pait et Nelson, 2002).

2.1.1.1. Chez la femelle : 17β -oestradiol

D'après Devlin et Nagahama (2002), les deux couches cellulaires du follicule ovarien jouent un rôle distinct dans la synthèse de stéroïdes. Sous l'influence de la GtHI, les cellules thécales synthétisent les enzymes (P450_{scc}, 3β -HSD, P450_{c17}, 17β -HSD) nécessaires à la production de testostérone (T) et autres précurseurs d'androgènes (Nagahama, 1997). Les cellules de la granulosa sont ensuite capables de convertir cette testostérone en 17β -oestradiol (17β -E₂) et ce, via l'action de l'enzyme aromatasase (P450_{arom}) produite également sous l'influence de la GtHI.

Le 17β -oestradiol agit alors au niveau de la gonade pour stimuler le développement des ovocytes. Mais il contrôle aussi l'expression de gènes dans d'autres organes auxquels il aboutit après son transport dans le système sanguin. Notamment, l'expression du gène de la vitellogénine (VTG) se produit suite à l'association du complexe « 17β -oestradiol - récepteur à l'oestrogène » aux régions régulatrices oestrogènes-dépendantes du promoteur de ce gène (Devlin et Nagahama, 2002). Cette phospholipoprotéine est synthétisée au niveau du foie des

femelles et transportée jusqu'à l'ovaire via le système sanguin. Puis, grâce à la GtHI, la VTG est incorporée dans l'ovocyte où elle sera utilisée par la larve en développement en tant que source d'énergie (figure 2.1.3).

2.1.1.2. Chez le mâle : 11-kétotestostérone

La GtHI augmente pendant la spermatogenèse et diminue à l'approche de l'étape finale de spermiation. Les GtHs stimulent la prolifération des spermatogonies ainsi que la synthèse d'androgènes nécessaires à la gamétogenèse et au développement des caractéristiques sexuelles secondaires. La synthèse d'androgènes se produit dans les cellules interstitielles analogues aux cellules de Leydig et l'androgène majeur est la 11-kétotestostérone (11-KT) plutôt que la testostérone (Devlin et Nagahama, 2002). Les principales actions de la 11-KT sont la régulation de la pulsativité du GnRH, la spermatogenèse, le comportement mâle et le fonctionnement normal des glandes annexes.

2.1.2. Maturation finale

2.1.2.1. Chez la femelle

Une fois la croissance ovocytaire terminée (vitellogenèse chez les ovipares), la méiose reprend, accompagnée de plusieurs transformations au sein du noyau et du cytoplasme. Ce processus, appelé la maturation, se produit peu avant l'ovulation et est absolument nécessaire à la réussite de la fécondation. La maturation ovocytaire est régulée par 3 médiateurs principaux : la GtHII, la MIH (Maturation Inducing Hormone) et le MPF (Maturation Promoting Factor) qui agissent respectivement sur les cellules du follicule ovarien, à la surface de l'ovocyte et dans le cytoplasme ovocytaire (Nagahama, 1997).

GtHII : Lorsque la maturation sexuelle approche, un changement se produit dans l'hypophyse de sorte qu'une nouvelle forme de gonadotropine est produite. La GtHII est alors libérée dans le sang, atteint la gonade et se lie aux récepteurs GtHIIR sur les follicules ovariens. Elle y provoque des changements au niveau des enzymes gonadiques et de la production de stéroïdes, résultant en la production de $17\alpha,20\beta$ -DP ($17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one), un stéroïde maturationnel (Nagahama, 1997 ; Devlin et Nagahama, 2002) (figure 2.1.4).

MIH : Au moment de la maturation, la production de $17\alpha,20\beta$ -DP (MIH) est fortement accrue (aux dépens de la testostérone et du 17β -oestradiol) alors qu'elle était faible durant la phase de vitellogenèse. L'action de la MIH à la surface de l'ovocyte (liaison à une protéine membranaire) suggère la présence d'un facteur cytoplasmique qui mène l'action de la MIH au sein même de l'ovocyte. Une découverte faite par Nagahama (Nagahama, 1994 in Nagahama, 1997) indique que la $17\alpha,20\beta$ -DP inhibe l'adénylate cyclase dans les préparations de membranes ovocytaires de truites arc-en-ciel *Oncorhynchus mikiss* (Walbaum, 1972), et de la sorte, induit une diminution de l'AMPc à l'intérieur de l'ovocyte. Ces événements intracellulaires suppriment la répression de la transcription de l'ARNm de la cycline B, ce qui permet la production de cette protéine (Devlin et Nagahama, 2002). A son tour, cette dernière s'associe avec les réserves de cdc-2 kinase de l'ovocyte. Ce complexe « cycline B-cdc-2 kinase » s'appelle le MPF (maturation promoting factor).

MPF : Il induit la GVBD (Germinal Vesicle Break-Down) et la maturation ovocytaire (figure 2.1.5).

2.1.2.2. Chez le mâle

Une diminution d'androgènes et une augmentation de progestagènes lors de l'étape de maturation sont attribuées à des niveaux plus élevés en GtHII. Notons toutefois que la 17 α -hydroxyprogestérone est produite dans les cellules de Leydig et que la 20 β -hydroxystéroïde déshydrogénase est synthétisée dans les spermatozoïdes et autres cellules germinales (Devlin et Nagahama, 2002).

2.1.3. Notion de pondeurs multiples et uniques

Il existe différentes stratégies de reproduction chez les téléostéens, notamment en terme de fréquence de ponte (Rinchard *et al.*, 1998) (figure 2.1.6). Il existe des poissons semelpares qui ne pondent qu'une seule fois au cours de leur vie, puis meurent, comme les saumons du pacifique (*Oncorhynchus* spp.).

Chez les itéropares, divers modes de pontes ont été observés. Certains, comme la truite commune *Salmo trutta fario* (Linnaeus, 1758) ou la perche commune *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758) déposent leurs œufs en une seule fois durant la saison de reproduction. Ce sont des pondeurs uniques. D'autres, comme le goujon *Gobio gobio* (Linnaeus, 1758) pondent plusieurs fois au cours d'une même saison de reproduction. Ce sont les pondeurs multiples. En dispersant la production annuelle d'œufs dans le temps, ces espèces peuvent s'assurer qu'au moins une portion de la ponte totale survivra. En effet, des changements dans la température ou dans d'autres facteurs environnementaux peuvent contribuer à la perte totale de la ponte chez un pondeur unique. De plus, dans les rivières où le nombre de sites de frai est limité, les pontes multiples y réduisent la compétition en fractionnant leur utilisation dans le temps. La catégorie des pondeurs multiples se scinde encore en deux classes : les pondeurs multiples déterminés et indéterminés. Cette classification est basée sur les caractéristiques du recrutement des ovocytes en croissance : chez les premiers, les ovocytes ont tous été recrutés avant la période de reproduction alors que chez les seconds, il existe un recrutement continu des ovocytes tout au long de la période de reproduction. D'autres encore présentent des pontes continues comme le Tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Enfin, certains, tels les esturgeons (*Acipenser* spp.), ne se reproduisent que tous les 2-3 ans et sont classés parmi les pondeurs irréguliers.

Certaines espèces sont également capables de modifier leur stratégie de ponte en fonction du milieu dans lequel elles vivent. Ainsi, dans les rivières peu productives, le chabot *Cottus gobio* (Linnaeus, 1758) ne pond qu'une seule fois, tandis que dans les rivières plus productives, la période de ponte s'étale sur plusieurs mois et chaque femelle pond à plusieurs reprises avec un maximum de 4 pontes par saison.

Ces pondeurs uniques et multiples se différencient par leur dynamique ovarienne et leurs niveaux en vitellogénine et en stéroïdes sexuels (figure 2.1.7). Il sera utile par la suite de vérifier si cette différenciation a ou non de l'importance dans l'interprétation des résultats de notre étude.

2.2. Les perturbateurs endocriniens

2.2.1. Notion de perturbateur endocrinien

Depuis quelques dizaines d'années, une inquiétude croissante naît du fait que de nombreux contaminants environnementaux, synthétiques ou naturels, peuvent agir sur le système endocrinien, un paramètre important pour l'organisme puisqu'il régule nombre de ses processus vitaux. Ces composés d'intérêt, agonistes ou antagonistes d'hormones naturelles endogènes, sont appelés « perturbateurs endocriniens » ou EDCs (Endocrine Disrupting Chemicals).

Diverses définitions de ces composés sont disponibles dans la littérature. Elles aboutissent, pour la plupart, à une description semblable :

- D'après Kavlok *et al.* (1996) (dans Pait et Nelson, 2002): « *Un perturbateur endocrinien peut être défini comme un agent exogène qui interfère avec la synthèse, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou encore l'élimination d'hormones corporelles naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation des processus de développement* ».
- Dans l'IEH (1999) : « *Un perturbateur endocrinien est une substance exogène qui cause des effets négatifs sur la santé d'un organisme intact, ou sa progéniture, suite à des changements dans la fonction endocrine. En l'absence de données in vivo, un perturbateur endocrinien « potentiel » est défini comme une substance qui possède certaines propriétés pour lesquelles on peut s'attendre à ce qu'elles mènent à de la perturbation endocrine chez un organisme intact.* ».

Bien que leur efficacité soit plusieurs centaines de fois moins importante que les hormones endogènes, les EDCs peuvent avoir des effets plus ou moins graves sur le développement et la santé d'un organisme, mais aussi sur sa capacité à se reproduire. De même, la survie et la reproduction de sa propre progéniture peuvent être menacées.

2.2.2. Identification et source des principaux EDCs

Les EDCs comprennent une grande diversité de produits synthétiques d'origine industrielle, domestique ou agricole mais aussi quelques composés naturels : le bisphénol A (BPA), les alkylphénols polyéthoxylates (APEs) et les alkylphénols (APs), les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (PAHs), les pesticides tels l'endosulfan, le lindane, le DDT et l'atrazine, les Poly-Chloro-Biphényles (PCBs), les dioxines, les phtalates (PAEs), les phytoestrogènes, les oestrogènes naturels ou synthétiques, ainsi que plusieurs métaux comme le cadmium, le plomb et le mercure. Notons que la liste est loin d'être exhaustive.

Le tableau 2.2.1 ci-contre présente les principaux EDCs connus ainsi que leur utilisation. La figure 2.2.2 présente les formules chimiques de quelques-uns de ces composés.

2.2.3. Composition des effluents de Station d'Épuration (STEP)

Si les stations d'épuration jouent un rôle important dans la limitation des pollutions de l'écosystème aquatique induites par les effluents domestiques, elles constituent cependant des sources majeures et ponctuelles d'EDCs dans l'environnement, suite à l'élimination incomplète d'une grande partie des polluants qui s'y retrouvent (Gomes *et al.*, 2003). En

réalité, certaines molécules telles les hormones endogènes, les hormones synthétiques, ou encore les alkylphénols, persistent malgré les processus d'épuration. Leurs effets peuvent y être activés, voire augmentés (Aguayo *et al.*, 2004). A titre d'exemple, les APEs ne sont pas oestrogéniques. Cependant, ils sont partiellement dégradés durant les traitements d'épuration (perte de la chaîne polyéthoxylate), ce qui aboutit à la libération d'alkylphénols mono, di-éthoxylates ou d'alkylphénols libres. Ces derniers, dont les représentants les plus courants sont le nonylphénol (NP) et l'octylphénol (OP), sont par contre oestrogéniques (Sonnonstein et Soto, 1998).

De nombreuses études indiquent que les effluents d'épuration sont des mélanges complexes de composés naturels et synthétiques. Le nombre exact de produits chimiques présents dans ces effluents est inconnu à ce jour car la dégradation microbienne des polluants entrants au sein des STEP résulte en une plus grande variété de produits à la sortie, la majorité de ceux-ci n'étant pas encore identifiée (Jobling *et al.*, 1995). De plus, les effluents de STEP présentent une variabilité chimique importante en fonction du mode de vie et du type d'activités anthropiques exercées dans la région. Ceci rend l'analyse approfondie des effluents de stations d'épuration relativement difficile. Toutefois, plusieurs chercheurs se sont penchés sur le sujet. Aguayo *et al.* (2004) ont analysé 7 effluents de STEP dans les alentours de Madrid en Espagne. Au total, plus de 49 composés ont été identifiés, certains étant plus fréquemment détectés que d'autres (tableau 2.2.3). Une autre étude menée par Nakada *et al.* (2004) indique la présence d'APs en concentration de 2 ordres de grandeur plus élevée que les autres composés (soit 128 ng/L d'OP et 553ng/L de NP en moyenne) (tableau 2.2.4). Ils détectèrent du BPA et des PAEs dans l'analyse de l'effluent ainsi que les oestrogènes naturels E_1 (oestrone) et $17\beta-E_2$ (17β -oestradiol) qui ont pu être quantifiés (moyenne de 31,4ng/L et 4,45ng/L respectivement). Il semble cependant que les concentrations de NP et OP soient bien en dessous du seuil pour lequel la perturbation endocrine apparaît chez les poissons sauvages. Par contre, les concentrations moyennes en oestrogènes endogènes sont fort proches de leur seuil de perturbation endocrine, suggérant que les oestrogènes naturels sont les principaux responsables de l'oestrogénicité de l'effluent. Ces oestrogènes sont présents dans les eaux usées domestiques ainsi que dans les rivières du fait que humains et animaux les excrètent en de relativement grandes quantités. Par exemple, l'humain évacue entre 0,002 et 0,10 mg de l'hormone endogène 17β -oestradiol chaque jour, voire même 30mg chez la femme enceinte (Huang et Sedlak, 2001). De plus, les oestrogènes synthétiques s'ajoutent à leurs homologues naturels. Ces derniers sont abondamment sécrétés parce qu'ils sont régulièrement administrés sous la forme de contraceptifs oraux et lors de traitements hormonaux (Huang et Sedlak, 2001). Cependant, ceux-ci possèdent une activité oestrogénique faible par rapport aux oestrogènes naturels.

Dans le corps humain et animal, les oestrogènes sont soumis à diverses transformations au niveau du foie (oxydation, hydroxylation, méthylation, conjugaison avec de l'acide glucoronique et du sulfate). Les composés sont alors excrétés sous une forme inactive et conjuguée. Mais, malgré cette absence d'activité biologique, ils restent pourtant des précurseurs capables de se reconvertir. Ceci se produit grâce aux bactéries présentes dans les STEP qui clivent ces conjugués inactifs en stéroïdes actifs avant leur libération dans l'environnement (Ying *et al.*, 2002b). L'efficacité d'élimination de tels composés dépend de la méthode de traitement employée. Le système de boues activées est le type de traitement biologique le plus commun et semble être, de façon générale, une méthode efficace pour la destruction d'une grande partie des oestrogènes naturels et synthétiques (Aguayo *et al.*, 2004).

2.2.4. Le devenir des EDCs dans l'environnement

Le danger que représente une substance chimique dépend bien sûr de sa toxicité propre mais également de la dose reçue par l'organisme cible, c'est-à-dire de la fraction biodisponible du polluant (figure 2.2.5). Il est donc important de retenir certaines notions sur le transport et le destin des polluants dans l'environnement afin de visualiser le degré d'exposition des individus. Dans le cadre de cette étude, nous nous pencherons plus spécifiquement sur le cas de l'écosystème aquatique.

En bref, les composés entrant dans l'environnement peuvent être transportés, dissous, dilués dans l'eau, peuvent également s'adsorber et se concentrer dans certains compartiments de l'écosystème (par exemple : les sédiments). Ils peuvent aussi être biodégradés en d'autres molécules parfois plus ou moins actives que la substance mère et finalement s'accumuler dans un organisme et au travers de la chaîne alimentaire.

L'importance de tous ces phénomènes va dépendre des caractéristiques physico-chimiques de la substance même (solubilité, pression de vaporisation, capacité de bio et photodégradation, capacité de bioconcentration...) mais aussi des conditions environnementales présentes (température, pH, salinité, activité microbienne, luminosité). Par exemple, d'après le relevé des propriétés physicochimiques des oestrogènes naturels et synthétiques, il semble qu'il s'agisse de composés organiques hydrophobes faiblement volatiles mais que les oestrogènes synthétiques soient moins solubles que les naturels (solubilité de 13mg/L d'eau pour le 17 β -oestradiol contre 4,8 mg/L d'eau et 0,3mg/L d'eau respectivement pour l'éthinyl-oestradiol EE₂ et le mestranol MeEE₂) (Ying *et al.*, 2002b).

Les points ci-dessous présentent en détail ces étapes et ont été relativement bien développés dans le document de l'IEH (1999) qui servira donc de support principal pour cette partie du travail.

2.2.4.1. La solubilité et l'adsorption : influence sur la biodisponibilité

La solubilité dans l'eau et l'adsorption sur une matrice solide (sédiments) sont deux facteurs qui influencent la biodisponibilité des perturbateurs endocriniens pour les organismes. Tous deux dépendent de la forme, de la taille, du contenu en groupes fonctionnels de la molécule. Une faible solubilité et une forte adsorption réduisent la quantité du composé présent dans la phase aqueuse par rapport aux sédiments avec, pour conséquence, une diminution de son activité biologique mais une augmentation de sa persistance. C'est notamment le cas des APEs qui sont des substances hydrophobes ayant un coefficient d'adsorption élevé dans le sol et les sédiments (Ying *et al.*, 2002a).

2.2.4.2. Dégradation environnementale et biotransformation

Les EDCs peuvent se dégrader dans l'environnement sous l'influence de facteurs physico-chimiques tels la lumière (photodégradation) mais aussi par l'action de microorganismes.

Les bactéries et les champignons jouent un rôle fondamental dans la transformation, la toxicité et la biodisponibilité de ces composés organiques. Par exemple, une première dégradation microbienne des APEs a lieu soit au sein des STEP ou dans l'environnement (Ying *et al.*, 2002a). Elle génère des APs (alkylphénols), molécules plus courtes, plus persistantes, et plus lipophiles comme le nonylphénol ou l'octylphénol. Diverses études ont montré que les métabolites d'APEs sont plus toxiques que les substances mères.

2.2.4.3. Voie de pénétration dans l'organisme et absorption

Chez le poisson, les EDCs pénètrent l'organisme via deux voies : au travers des branchies et de la peau ou via l'ingestion de nourriture contaminée. Le taux de pénétration par les branchies varie en fonction de la grandeur de la surface représentée par les branchies et est donc inversement proportionnel à la taille de l'animal. En effet, un individu de grande taille a besoin de moins d'énergie pour les processus métaboliques et possède une plus petite surface branchiale par rapport à un petit poisson. Il est donc moins exposé au polluant. Il en est de même pour le rapport surface/volume au niveau de la peau. La pénétration de substances présentes dans l'eau et le sédiment, via l'ingestion de nourriture, dépend des préférences alimentaires de l'individu et de son taux d'ingestion.

Après la pénétration dans l'organisme, le polluant est plus ou moins fortement absorbé. L'absorption d'un xénobiotique est le pourcentage de la substance qui est accumulée dans le corps de l'organisme après l'ingestion de nourriture, de sédiments ou d'eau contaminés. L'efficacité de l'absorption dépend du degré d'exposition de l'organisme aux compartiments contaminés, des propriétés de ces mêmes compartiments, de la voie de pénétration, mais aussi de la capacité de l'organisme à métaboliser de telles substances. En effet, pour qu'un composé exerce sa toxicité sur un organisme, il doit entrer dans le corps et atteindre sa cible AVANT que tout métabolisme ou dégradation ne se produise (Pickford *et al.* 2003). Or, lorsque le polluant pénètre par voie branchiale, il se retrouve dans le sang oxygéné qui est transporté directement vers la plupart des organes, y compris les gonades, avant que toute détoxification n'ait lieu. Les toxiques pénétrant via la peau évitent aussi une dégradation immédiate et atteignent également les organes sous leur forme intacte. Par contre, les composés ingérés via la nourriture sont soumis au métabolisme du système digestif avant de passer dans le sang. Le toxique absorbé circule alors vers le foie où les enzymes de détoxification de phase I et II le métaboliseront totalement ou en partie. Pickford *et al.* (2003) confirment cela dans leur recherche sur l'efficacité du 4-*tert*-nonylphénol administré par deux voies différentes : l'eau et la nourriture. Ils ont observé une différence de sensibilité des poissons, la première voie étant la plus efficace en terme d'intensité de la réponse (induction de la vitellogénine). Ces chercheurs ont conclu que la différence majeure dans la puissance d'action et l'intensité des réponses obtenues sont probablement dues à la différence de dégradation des toxiques passant l'une ou l'autre voie.

A ce stade, il peut se révéler intéressant de fournir quelques chiffres concernant la distribution des polluants dans les tissus d'un organisme. Une étude menée par Coldham et ses collaborateurs en 1998 indique que lorsque des truites sont exposées au 4-nonylphénol, le polluant est rapidement métabolisé et excrété à en juger par les concentrations élevées en résidus d'APEs retrouvés dans la bile, le foie, les excréments et les caeca pyloriques, 144h après une exposition à de l'eau contaminée (tableau 2.2.6). Les muscles quant à eux contiennent de fortes concentrations en composés parents. Ce n'est nullement le cas du foie, qui ne contient que des résidus d'APEs, ce qui reflète sa capacité à métaboliser les xénobiotiques. Ainsi, malgré une métabolisation rapide, une exposition chronique à une eau polluée peut faciliter l'accumulation continue de composés parents dans les muscles squelettiques avec pour conséquence la formation d'un dépôt substantiel de ce polluant étant donné que le tissu musculaire représente la majorité de la masse corporelle du poisson.

2.2.4.4. Bioaccumulation dans un organisme et dans la chaîne trophique

Les sédiments constituent une sorte d'égout pour la plupart des polluants faiblement hydrosolubles, qui s'y retrouvent à de plus grandes concentrations que dans l'eau. Ces contaminants absorbés peuvent alors s'accumuler suffisamment dans les tissus de proies benthiques et produire des effets néfastes sur ces dernières. Ces organismes sont susceptibles de transférer ces contaminants à leurs prédateurs et ainsi faire circuler les composés à travers les niveaux trophiques, selon les habitudes alimentaires des organismes.

Notons que le taux de bioconcentration est élevé chez les animaux du haut de la chaîne alimentaire car leur contenu en lipides est relativement élevé et leur capacité d'élimination des toxiques est faible. Cela résulte en une bioamplification, qui se produit malheureusement avec la plupart des EDCs. Les prédateurs sont donc souvent exposés à des niveaux beaucoup plus élevés de contaminants par rapport à leurs proies et aux organismes de faible niveau trophique, ce qui peut avoir de graves répercussions sur la santé des individus. De plus, les prédateurs sont restreints en nombre, sont caractérisés par un faible taux de reproduction et sont assez lents à se remettre d'un déclin de population, ce qui les rend encore plus vulnérables.

2.2.5. Effets des perturbateurs endocriniens

2.2.5.1. Introduction

La perturbation endocrine chez les poissons ne semble pas être un phénomène ubiquiste. Elle est généralement associée à des niveaux élevés de contamination et en particulier à trois types d'usages terrestres : les STEP, les usines de pâte à papier et les régions de fortes contamination et activité industrielle (Pait et Nelson, 2002). En effet, les EDCs étant, pour la plupart, moins puissants que leurs homologues endogènes, il semble peu probable que les faibles concentrations retrouvées dans l'environnement induisent des problèmes significatifs chez les organismes. Par contre, il n'est pas à exclure que l'exposition aux « mélanges » d'EDCs présents à ces mêmes concentrations (notamment au niveau des STEP), puisse causer des effets additifs ou synergiques (Jobling *et al.*, 1998).

L'étude de l'impact des EDCs n'est cependant pas simple car divers paramètres (facteurs physiologiques, biochimiques et génétiques) peuvent influencer la réponse des organismes qui y sont exposés. Ainsi, l'âge, le statut sexuel, le sexe, le système endocrinien et les niveaux endogènes de stéroïdes sexuels peuvent influencer la sensibilité des organismes aquatiques et terrestres aux EDCs (tableau 2.2.7) (Kawai *et al.*, 2003). De même, les facteurs environnementaux tels que le phénomène de dilution peuvent modifier la réponse des organismes face aux polluants chimiques. Dans certains cas, particulièrement dans les petites rivières, l'effluent peut constituer la majorité du débit (jusqu'à 80-90%) en période d'étiage de sorte que, de longues portions du cours d'eau peuvent être oestrogéniques pour les poissons (Sumpter, 1995). Par contre, une étude menée par Carballo et ses collaborateurs (2004) (Espagne) concernant l'impact des effluents de STEP sur des carpes *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) vivant en aval de ces rejets, ne montrait aucun effet significatif sur les paramètres mesurés (Rapport Gonado-Somatique ou RGS, niveau en vitellogénine, histologie des gonades) car le volume d'eau de la rivière semblait suffisant pour permettre une dilution importante de l'effluent.

Mais s'il est impossible de généraliser les impacts des EDCs à tous les sites, périodes, espèces et individus, certains effets ont souvent été décrits. Ainsi, le point suivant présente quelques-uns des effets des EDCs au niveau du système reproducteur du poisson.

2.2.5.2. Réponses individuelles au niveau moléculaire, cellulaire et biochimique

A) Récepteurs hormonaux

Puisque de nombreuses études associent les effluents de STEP et les effets oestrogéniques, il semble intéressant de savoir que les réponses biologiques produites par les oestrogènes sont très complexes et médiées par des récepteurs spécifiques (Lye *et al.*, 1997). Ces récepteurs sont en fait des facteurs de transcription qui amènent des signaux extracellulaires jusqu'au noyau (Indarto et Izawa, 2001). L'inconvénient avec ce type de récepteurs est qu'ils ne sont pas particulièrement sélectifs et qu'une variété de composés chimiques peuvent interagir avec eux pour induire une réponse (Lye *et al.*, 1997). Ainsi, certains EDCs, agonistes ou antagonistes, et dont la structure est similaire aux hormones endogènes, sont capables de se lier à ces récepteurs, ce qui peut mener à une activité cellulaire anormale (Arukwe, 2001).

B) Détoxification hépatique

Les animaux étant continuellement exposés à des composés étrangers pouvant affecter leur survie et leur capacité reproductrice, l'évolution a favorisé l'apparition de mécanismes d'élimination des xénobiotiques (Crain et Guillette, 1997). En effet, la plupart des xénobiotiques sont modifiés *in vivo* par des systèmes enzymatiques qui les convertissent en métabolites plus polaires généralement moins toxiques que les composés mères et qui, à cause de leur plus grande solubilité dans l'eau, tendent à être plus facilement éliminés par la bile ou l'urine (Cravedi *et al.*, 2001). Cette élimination est possible grâce à deux types de réactions : les réactions de phase I et II. Le premier type consiste en l'introduction d'un groupement polaire dans la molécule, réaction catalysée par le cytochrome P450. Tandis que le second type de réactions est caractérisé par la conjugaison du composé et/ou de ces métabolites de phase I avec des constituants polaires tels l'acide glucoronique, les sulfates ou le glutathion. Les résultats obtenus par Arukwe et ses collaborateurs (2000(b)) confirment d'ailleurs cette métabolisation des xénobiotiques (tableau 2.2.8). Toutefois, les enzymes de détoxification des xénobiotiques peuvent transformer les composés en molécules électrophiles et hautement réactives capables de se lier avec d'autres macromolécules pour produire des effets cytotoxiques, tératogéniques, mutagéniques et carcinogéniques (Cravedi *et al.*, 2001). Une expérience réalisée par Jobling et Sumpter (1993) démontre aussi ce phénomène d'activation des xénobiotiques par le système de détoxification (encadré 2.2.9).

D'une façon générale, l'activité de détoxification hépatique est évaluée par la mesure de l'activité EROD (Ethoxy-Resorufine-O-Dééthylase). Faller et ses collaborateurs (2003) (Suisse) ont pu montrer que l'activité EROD était significativement plus élevée chez les goujons capturés en aval des STEP par rapport à ceux situés en amont et que cette différence était probablement attribuée aux contaminants présents dans les effluents de STEP. Le tableau 2.2.10 ci-contre résume les points essentiels de quelques grandes études concernant l'induction des systèmes enzymatiques de détoxification par les xénobiotiques.

C) Perturbation de l'équilibre hormonal

Les composés environnementaux peuvent affecter la physiologie endocrine par l'intermédiaire d'effets sur la synthèse, le transport, et le métabolisme des hormones, de même que sur leur activité biologique (Van der Kraak *et al.*, 1998). Diverses études indiquent que certains EDCs sont capables de modifier le processus de stéroïdogénèse. Ainsi, Monteiro et ses collaborateurs (2000) ont découvert que certains PAHs réduisaient la synthèse d'androsténédione et d'E₂ suite à leurs effets inhibiteurs sur plusieurs enzymes stéroïdogéniques (P450-17,20lyase ; 17β-HSD ; P450aromatase) chez la plie *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758) (figure 2.2.11).

De même, les xénobiotiques peuvent avoir des effets sur le catabolisme et l'excrétion des stéroïdes en altérant l'activité des enzymes qui en régulent la dégradation (Van der Kraak *et al.*, 1998). Plusieurs enzymes du cytochrome P450 impliqué dans les processus de détoxification sont aussi impliquées dans la dégradation des stéroïdes (système MFO ; Mixed Function Oxygenases). Dès lors, cette famille d'enzymes pouvant être induite suite à l'exposition à un polluant peut aussi altérer l'homéostasie hormonale de l'animal (Crain et Guillette, 1997). Une telle induction de l'activité MFO peut résulter en une oxydation plus rapide des stéroïdes si l'enzyme de dégradation est disponible à ces fins, mais peut également diminuer le catabolisme des stéroïdes si le polluant est préférentiellement pris comme substrat de l'enzyme (Kime, 1999).

Une fois le stéroïde synthétisé, il est libéré dans le flux sanguin dans lequel il circule sous deux formes selon le degré d'hydrophobicité de la molécule : librement si elle est hydrosoluble, ou liée à une protéine de transport (SHBG), si elle est hydrophobe. Cette liaison influence le taux d'élimination métabolique hépatique de ces hormones, les stéroïdes non liés ou faiblement liés étant plus rapidement éliminés du plasma (Van der Kraak *et al.*, 1998). Dès lors, les polluants chimiques capables de se lier aux SHBG peuvent déplacer les hormones endogènes de ces sites de liaison et ainsi abaisser la concentration corporelle de ces dernières suite à une élimination plus importante (Van der Kraak *et al.*, 1998). Une autre conséquence de la liaison des EDCs aux SHBG peut être une modulation sélective de ces polluants (ainsi que des stéroïdes endogènes plasmatiques) libres et donc biodisponibles pour les tissus cibles (Tollefsen, 2002).

Le tableau 2.2.12 présente la synthèse de quelques études sur la perturbation de l'équilibre hormonal par les EDCs chez le poisson.

D) Induction de la vitellogénine

L'induction de la vitellogénine (VTG) chez le mâle semble être un phénomène répandu dans l'environnement aquatique près des rejets de type industriel et d'égouts (Arukwe, 2001). L'analyse de la vitellogénine plasmatique peut fournir une preuve que la population de poissons a été exposée à des contaminants oestrogéniques. En 1998, Jobling et ses collaborateurs (Angleterre) ont montré que la concentration en vitellogénine des gardons mâles en aval des STEP était plus grande en comparaison avec les poissons de l'amont ou dans les sites de contrôle, suggérant une exposition aux oestrogènes (figure 2.2.13). Le tableau 2.2.14 résume les principales études concernant l'induction de la VTG.

Normalement, la vitellogénine est absente ou en faible concentration chez le mâle (Panter *et al.*, 1998) (Pait et Nelson, 2002). Cela se comprend aisément puisqu'il n'y a pas de source interne d'oestrogènes chez l'individu sain (Solé *et al.*, 2002). Cependant, puisque les mâles possèdent également des récepteurs à l'E₂, notamment au niveau de leurs hépatocytes, ils sont capables de synthétiser de la vitellogénine sous l'influence de xénoestrogènes (Pait et

Nelson, 2002). La VTG n'ayant pas de fonctions chez eux (Arukwe, 2001), les mâles sont incapables de l'éliminer rapidement de leur plasma. Il faut environ 5 mois pour l'évacuation complète de la vitellogénine accumulée dans leur sang (Harries *et al.*, 1996). Les conséquences directes de cette synthèse chez le mâle incluent une réduction du calcium dans les écailles et le squelette, une hypertrophie du foie et des dommages aux reins (Arukwe, 2001), de même qu'une augmentation de la sensibilité aux maladies, une diminution de la croissance testiculaire, une inhibition de la spermatogenèse, et des changements au niveau de la maturité sexuelle (Solé *et al.*, 2001). Cela représente aussi un gaspillage substantiel d'énergie ainsi détournée vers la synthèse de vitellogénine au détriment de la production d'autres protéines vitales (Solé *et al.*, 2003(b)). Etant capable de se lier au calcium, magnésium, zinc, fer et cuivre, la vitellogénine représente aussi une voie d'exposition aux métaux lourds suite à son accumulation dans les ovocytes. En effet, une injection de cadmium-vitellogénine à une femelle résulte en l'incorporation du cadmium dans les ovaires (Crain et Guillette, 1997).

2.2.5.3. Réponses individuelles morphologiques et comportementales

A) Effets indirects et directs sur les gamètes

La production de gamètes de bonne qualité dépend d'un milieu hormonal optimal durant leur développement. Dès lors, toute perturbation ou tout polluant affectant l'équilibre hormonal peut résulter, indirectement, en la formation d'ovocytes ou de sperme anormal (Kime, 1999 ; Kime et Nash, 1999). Notamment, des altérations de la synthèse d'E₂ peuvent réduire le stockage de VTG dans l'ovocyte et de ce fait diminuer la viabilité de ce dernier (Solé *et al.*, 2003 (b)). Une inhibition de la production d'E₂ lors des premiers stades de croissance ovocytaire peut provoquer un retard dans le développement de l'ovaire. Par contre, une telle inhibition à la fin de la vitellogenèse peut avancer l'approche du stade de maturation finale, l'E₂ exerçant à ce moment un impact négatif sur le développement des ovocytes (Afonso *et al.*, 1997). Une diminution d'E₂ peut également résulter soit en une diminution du nombre d'œufs produits, soit en la production d'un même nombre d'œufs mais qui seront de plus petite taille, l'un et l'autre cas pouvant ainsi affecter la quantité de progéniture viable (Kime, 1999). Chez le mâle, la qualité et la quantité du sperme peuvent être affectées par la perturbation endocrine d'une façon similaire à ce qui se passe chez les femelles. En effet, des changements dans les sécrétions hypothalamiques et hypophysaires ou dans la capacité des cellules de Leydig à synthétiser le stéroïde correct au moment approprié peuvent affecter le développement du sperme (Kime et Nash, 1999).

De plus, nombreux composés, qu'ils possèdent ou non une activité hormonale, ont aussi des effets toxiques directs sur les gamètes (Kime, 1999). Ainsi, chez les femelles exposées à de tels composés, la fécondation et le développement peuvent être affectés par les xénobiotiques bioaccumulés chez la mère et incorporés dans l'ovocyte via les protéines de l'œuf telles que la VTG (Kime et Nash, 1999). Un autre exemple est le cas du mercure. Ce dernier a un effet direct sur le micropyle et prévient toute entrée de sperme (Kime, 1999). De même, chez les mâles, le mercure a un impact considérable sur la mobilité des spermatozoïdes, facteur non négligeable altérant le pouvoir fécondant. De plus, le mercure peut aussi entraîner des altérations de la morphologie du sperme, causant des dommages au flagelle (Kime, 1999).

B) Croissance, morphologie et pathologie gonadale

Intersexualité : Diverses études montrent l'impact des effluents de STEP et des composés qu'ils contiennent sur l'incidence de l'intersexualité. Jobling et ses collaborateurs (1998) (Angleterre) ont montré que les gardons mâles et femelles échantillonnés dans 8 rivières contaminées par des effluents de STEP et 5 sites de références semblaient être d'apparence normale. Cependant, un examen plus approfondi révéla que de nombreux mâles développaient un ovotestis, c'est-à-dire qu'ils possédaient simultanément les caractéristiques des gonades de mâles et de femelles. Bien que les intersexes étaient présents à tous les sites, le taux d'intersexualité et le degré de sévérité de l'intersexualité observée étaient plus élevés en aval des STEP des 8 rivières contaminées (figures 2.2.15 et 2.2.16). Il est intéressant de savoir que les intersexes ont généralement un statut endocrinien altéré et une élévation de la concentration en VTG plasmatique (Jobling *et al.*, 2002).

Croissance gonade : La croissance gonadale peut être affectée par l'exposition à des EDCs. Une exposition de Medakas japonais *Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel, 1846) à différentes concentrations d'effluents de STEP (0%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50% + un contrôle positif de 100ng/L EE₂ pendant 28 jours) inhibe la croissance de la gonade, les mâles étant plus sensibles que les femelles (diminution significative de la croissance gonadique à 10% de concentration de l'effluent pour les mâles contre 20% de concentration de l'effluent pour les femelles) (Ma *et al.*, 2004).

Histopathologie des gonades : L'exposition de mâles à des composés oestrogéniques peut induire de profonds changements au sein du tissu testiculaire. Gimeno et ses collaborateurs (1998) ont exposé des mâles sexuellement matures de carpe à une concentration subléthale de 4-tert-pentylphénol et d'E₂ pendant 3 mois. L'examen histologique des testicules révèle une disparition progressive des spermatozoïdes et des cystes spermatogéniques, ainsi que l'apparition d'altérations pathologiques : fibrose, vacuolisation et atrophie de l'épithélium germinale, de même qu'une réduction du diamètre des tubules séminifères. Dans certains cas, le testicule ne contenait plus que des spermatogonies A.

D'une façon générale, les ovaires des femelles semblent être moins affectés par les composés oestrogéniques, notamment ceux contenus dans les effluents de STEP. Toutefois, Jobling et ses collaborateurs (2002) (Angleterre) ont montré une plus grande incidence du phénomène d'atrésie chez les poissons exposés par rapport aux individus contrôles, ce qui suggère que les poissons exposés peuvent avoir une fécondité plus faible. L'atrésie étant un événement peu commun chez les femelles en bonne santé, on le pense lié à une mauvaise nutrition et/ou à un stress environnemental. Mais dans cette étude, le facteur de condition ne montre aucune différence entre les différents groupes de poissons, suggérant que l'augmentation de l'atrésie serait due à une exposition prolongée aux polluants environnementaux (figure 2.2.17).

Différentiation sexuelle : Il est intéressant de noter que la testostérone et l'oestradiol sont normalement en quantité importante dans les oeufs de poissons, résultant des niveaux significativement élevés de stéroïdes sexuels présents chez la femelle mature (Devlin et Nagahama, 2002). Cependant, ces concentrations élevées de stéroïdes à l'intérieur de l'œuf baissent très tôt au cours du développement, de sorte qu'au moment de la détermination sexuelle, les stéroïdes transmis par la mère sont indétectables, ne surpassant pas la production de stéroïdes endogènes produits par le jeune embryon, ces derniers étant responsables de la différenciation gonadique (Devlin et Nagahama 2002). Toutefois, durant le développement ovarien, lors de la mobilisation des réserves lipidiques, les EDCs qu'elles contiennent peuvent

être incorporés dans les ovocytes et seront présents durant la période critique de la différenciation sexuelle (Sumpter, 1995). Il s'agit en fait d'une période étroite comprenant 10 jours avant et 10 jours après l'éclosion. Durant cette période critique, le sexe phénotypique est labile et toute exposition aux hormones et aux EDCs peut affecter la différenciation sexuelle (Sumpter, 1995). De fait, Brion et ses collaborateurs (2004) ont exposé des poissons zèbres *Danio rerio* (Hamilton, 1822) juvéniles à de faibles concentrations d'oestradiol (5, 25, 100 ng/L pendant 3 semaines), représentatives de celles présentes dans l'environnement. Les résultats montrent une altération de la différenciation des cellules germinales en tissu testiculaire, menant à un retard de l'atteinte de la maturité sexuelle chez ces poissons une fois matures. Cela peut induire des effets néfastes sur les populations qui se reproduisent de façon saisonnière, puisque les gamètes risquent d'être produits à une période non-optimale pour la survie de la progéniture qui en découlera.

Le tableau 2.2.18 présente les données de quelques études sur l'histopathologie de gonades affectées par les EDCs.

C) Comportement et caractéristiques sexuelles secondaires

La maturation sexuelle incomplète ou altérée, résultant d'une exposition aux EDCs peut induire indirectement une perturbation du comportement et des caractéristiques sexuelles secondaires nécessaires à la communication en période de reproduction. En effet, les caractères sexuels secondaires et les marques corporelles des mâles durant la période de reproduction peuvent ne pas se développer correctement, menant à un comportement reproducteur anormal ou absent (Arukwe, 2001). Une explication possible pour la réduction du comportement reproducteur du mâle lors d'une exposition à l'E₂ ou aux effluents de STEP est que les EDCs pourraient influencer les systèmes de feedback des stéroïdes et la production d'androgènes chez le poisson, ces dernières hormones favorisant le comportement reproducteur, alors indirectement altéré (Bjerselius *et al.*, 2001 ; Schoenfuss *et al.*, 2002).

2.2.5.4. Réponses au niveau des populations

Lorsque l'on considère les effets des perturbateurs endocriniens au sein des écosystèmes, l'intérêt se porte inévitablement sur l'étude des niveaux d'organisation biologique plus élevés, c'est-à-dire le niveau de la population, des communautés et de l'écosystème. Toutefois, lorsque l'on étudie l'impact au niveau populationnel, il est extrêmement difficile d'établir des relations de cause à effet avec les polluants présents, telles celles obtenues pour des niveaux d'organisation biologique inférieurs. (IEH, 1999) Ainsi, si les impacts des EDCs ont été bien documentés, tant au niveau biochimique que cellulaire ou qu'au niveau de l'organisme, très peu d'études concernent les effets sur les plus hauts niveaux d'organisation (Porter et Janz, 2003). Cependant, certaines études se sont penchées sur le sujet. Smith et ses collaborateurs (1999) (Australie) ont découvert que, bien que la structure des communautés varie selon le temps et l'endroit, l'abondance et la richesse des populations de poissons en aval des effluents de STEP étaient moins grandes que dans les sites pris comme référence : ils constatèrent une diminution de 33% de la richesse spécifique des poissons. De même, Porter et Janz (2003) ont démontré que l'exposition aux effluents de STEP induisait une altération de la communauté piscicole, le site ayant une plus grande proportion d'espèces tolérantes et omnivores et une faible proportion de prédateurs du haut de la chaîne alimentaire.

2.2.5.5. Nature des effets : organisationnels ou activationnels

Il est possible de classer tous les effets présentés ci dessus en deux catégories selon le moment de l'exposition aux EDCs : il s'agit des effets organisationnels et activationnels. Les premiers concernent le développement du poisson au tout début de sa vie. En effet, toute exposition durant le développement embryonnaire est importante car elle peut mener à des modifications structurelles permanentes de divers systèmes (reproducteur, nerveux, immunitaire) (IEH, 1999). En effet, si la plupart des effets sur les individus adultes sont réversibles dès que l'exposition cesse, une exposition durant le développement et l'organogenèse peut résulter en divers effets délétères irréversibles (Sonnonstein et Soto, 1998). Par contre, les effets activationnels se produisent lorsqu'un EDC altère temporairement la fonction d'un tissu normalement organisé, c'est-à-dire chez l'individu adulte (Crain et Guillette, 1997) (Figure 2.2.19).

2.3. Notion de biomarqueur

2.3.1. Biomarqueur : signal précoce d'une perturbation écologique

Les études écologiques sur la biodiversité et les communautés sont traditionnellement utilisées dans le but d'évaluer la qualité de l'environnement, ce dernier étant souvent soumis à divers facteurs de stress et activités humaines susceptibles de nuire à la vie sauvage. Cependant, les impacts de nombreuses perturbations sur ces niveaux élevés d'organisation biologique ne peuvent, jusqu'à présent, être détectés qu'à posteriori (Vasseur et Cossu-leguille, 2003). Mais, à ce stade de perturbation, les processus de destruction de l'environnement sont tellement avancés qu'une action de restauration visant à remédier au problème se révélerait extrêmement lourde et coûteuse (Van der Oost *et al.*, 2003). De plus, lorsque la dégradation du milieu devient, à ce point évidente, un grand nombre d'espèces ont déjà disparu, ce qui limite l'efficacité de l'approche écologique. Tous ces éléments expliquent pourquoi la recherche sur les biomarqueurs en tant qu'*indicateurs précoces* de perturbations au niveau des organismes et des populations s'est développée durant ces dix dernières années (Vasseur et Cossu-leguille, 2003).

Cette approche écotoxicologique basée sur les biomarqueurs se base sur les informations selon lesquelles les effets affectant des niveaux d'organisation biologique plus élevés sont toujours précédés par des changements dans les processus biologiques au sein de l'organisme (figure 2.3.1) (Van der Oost *et al.*, 2003 ; Vasseur et Cossu-leguille, 2003). Ces modifications précoces, signalant des réponses qui se produiront plus tard dans le temps, sont utilisées en tant que biomarqueurs. Ces derniers peuvent donc être utilisés pour l'évaluation de l'état de santé des organismes et pour l'obtention de signaux d'avertissement précoces du danger présent dans l'environnement, permettant ainsi une intervention d'assainissement efficace avant l'apparition inévitable d'effets irréversibles (Lam et Gray, 2003 ; Van der Oost *et al.*, 2003).

2.3.2. Définition du biomarqueur

Il existe plusieurs définitions du terme biomarqueur. Elles soulignent généralement une tendance commune : le biomarqueur est une mesure reflétant une interaction entre un système biologique et un danger potentiel qui peut être chimique, physique ou biologique. Plus concrètement : « *un biomarqueur est défini comme un changement biologique, qu'il*

s'agisse d'une réponse moléculaire, cellulaire, physiologique ou de modification de comportement, et qui peut être corrélé à l'exposition à un ou plusieurs composés environnementaux et à leurs effets toxiques. » (Lam et Gray, 2003 ; Van der Oost *et al.*, 2003).

La notion de biomarqueur diffère de la notion de bioindicateur par son lien avec un autre niveau d'organisation biologique. En effet, si le biomarqueur est une réponse biologique mesurée à l'intérieur de l'organisme (ou dans ses produits tels l'urine, les excréments,...) et indiquant une déviation de l'état de santé par rapport à un individu sain, un bioindicateur est lui défini comme un organisme qui, par sa présence, son absence ou son comportement fournit des informations sur les conditions environnementales de son milieu de vie (Van der Oost *et al.*, 2003).

Différentes études indiquent que la présence de VTG plasmatique chez le mâle et une altération du contenu en VTG chez les femelles ont été acceptées en tant que biomarqueur d'exposition aux xénoestrogènes (Ankley *et al.*, 1998 ; Kime, 1999 ; Arukwe *et al.*, 2000(a) ; Solé *et al.*, 2001 ; Pait et Nelson, 2002 ; Solé *et al.*, 2003(b)). De même, l'activité des systèmes enzymatiques telle l'activité EROD est un bon biomarqueur d'exposition aux xénobiotiques (Vasseur et Cossu-leguille, 2003). L'histopathologie reçoit, elle aussi, de plus en plus d'attention car les changements histopathologiques sont souvent le résultat de l'intégration d'un grand nombre de processus physiologiques interactifs (Leino *et al.*, 2004).

2.3.3. Fiabilité et limitation des biomarqueurs

De façon à évaluer la qualité des biomarqueurs utilisés notamment chez les poissons, six critères de fiabilité sont proposés (Van der Oost *et al.*, 2003) :

- La méthode de mesure du biomarqueur doit être avant tout fiable.
- La réponse du biomarqueur doit être sensible à l'exposition et/ou à l'impact des polluants de façon à servir de signal d'avertissement.
- Il est nécessaire de disposer de données préalables sur le biomarqueur afin de distinguer la variabilité naturelle (bruit) du stress induit par le contaminant.
- L'impact d'autres facteurs que le polluant sur la réponse du biomarqueur doit être connus et pris en compte. Par exemple, puisque le cytochrome P450 est impliqué dans le métabolisme des stéroïdes, la mesure de l'activité de l'EROD (monooxygénase dépendante du cytochrome P450 1A) en tant que biomarqueur ne peut être influencée par le sexe et la reproduction. Cela requiert l'analyse séparée des mâles et des femelles ainsi que la prise en compte du frai et de la période de reproduction (Vasseur et Cossu-leguille, 2003).
- Le mécanisme sous-jacent de la réponse du biomarqueur à l'exposition au polluant doit être bien établi.
- La signification toxicologique du biomarqueur doit être connue, c'est-à-dire qu'il est important de connaître l'impact de la réponse du biomarqueur sur l'organisme.

Les biomarqueurs sont toutefois limités dans leur utilisation (Van der Oost *et al.*, 2003). Notamment, il a été suggéré que les biomarqueurs doivent être préférentiellement non-invasifs et non-destructifs afin de permettre ou de faciliter le monitoring des effets des polluants chez les espèces protégées ou en danger. L'utilisation de biomarqueurs requiert aussi une bonne compréhension des mécanismes sous-jacents aux réponses observées. Si les réponses des biomarqueurs sont puissantes car elles intègrent un grand nombre de facteurs environnementaux, écologiques et toxicologiques contrôlant et modulant l'impact des

contaminants environnementaux, ces mêmes facteurs peuvent aussi compliquer l'interprétation des résultats obtenus lorsque les conditions expérimentales ne sont pas correctement analysées ou contrôlées. Des exemples de tels facteurs sont la santé, la condition, le sexe, l'âge, le statut nutritionnel, l'activité métabolique, le comportement migrateur, les statut reproducteur et de développement de l'individu, la densité de population, de même que des facteurs tels la saison, la température ambiante, l'hétérogénéité de la pollution environnementale.

2.4. Sélection d'espèces sentinelles

2.4.1. Notion d'espèce sentinelle

La première étape dans ce type d'étude écotoxicologique est la recherche d'organismes qui serviront d'indicateurs, d'alarmes pour la détection des perturbations endocriniennes. Ces organismes d'étude sont ainsi appelés « espèces sentinelles ». Il existe une série de critères indicatifs à appliquer lors de la sélection de telles espèces (IEH, 1999 ; Taylor *et al.*, 1999) (encadré 2.4.1).

Encadré 2.4.1: Critères de choix d'une espèce sentinelle (IEH, 1999 ; Taylor *et al.*, 1999)

- Commune ou largement répandue
- Importante d'un point de vue écologique ou économique
- Soumise probablement à une exposition significative
- Comprenant une large gamme de styles de vie et d'habitudes alimentaires
- Biologie bien comprise.
- Relativement peu sensible aux toxiques conventionnels, classiques
- Pouvant être soumise à des expériences et pouvant être « cultivée », élevée en laboratoire
- sédentaire ou territorial
- Système endocrinien connu au moins en partie
- Reproduction sexuée et préférentiellement dimorphisme sexuel
- Idéalement, temps court entre générations successives

Sur base de ces critères, plusieurs types d'organismes ont été proposés en tant qu'espèces sentinelles adaptées à ce type d'étude. Ainsi, peuvent convenir les organismes suivants : les annélides, les mollusques, les crustacés, les insectes (chironomidés), les échinodermes, les mammifères aquatiques, les oiseaux piscivores, et les poissons (IEH, 1999). Ces derniers sont de bons modèles pour l'étude des stress environnementaux parce qu'ils vivent dans des habitats fort variables et doivent s'adapter à divers facteurs tels la température, l'oxygène dissous, le pH, la pression de l'eau, la salinité, et les perturbateurs extrinsèques tels les contaminants chimiques (Ostrander, 2000). De plus, les poissons sont les organismes aquatiques les plus exposés aux risques de pollution (Kime, 1999).

Parce qu'ils sont plus bas que les mammifères dans l'échelle de l'évolution, ils ont également des fonctions biologiques moins complexes et donc plus faciles à étudier (Ostrander, 2000). Malgré ces différences, l'utilisation des poissons reste intéressante suite à la similarité de leur système endocrinien avec celui des vertébrés supérieurs, ce qui permettra de généraliser les résultats acquis aux mammifères moyennant quelques précautions (Paït et Nelson, 2002).

Les poissons constituent aussi un modèle utile dans la détection des effets des polluants environnementaux sur la fonction reproductive car leur grand avantage consiste en

la quantité considérable d'œufs et de sperme produits et pouvant être analysés pour l'évaluation des effets des polluants (Kime, 1999).

Les poissons les plus couramment utilisés dans les études écotoxicologiques sont la carpe commune et le gardon, deux poissons bien connus dans nos régions, mais aussi des poissons tels le medaka japonais (figure 2.4.2), le vairon américain *Pimephales promelas* (Rafinesque, 1820) (figure 2.4.3), et également le poisson zèbre (figure 2.4.4) (Ostrander, 2000).

2.4.2. Ecologie des espèces étudiées

2.4.2.1. Le chabot

Le chabot appartient à l'ordre des Scorpaéniformes et la famille des Cottidae. Sa silhouette est typique : une grosse tête aplatie munie d'une large bouche terminale supérieure. Une épine est visible sur chaque préopercule et la couleur de son corps est brun tacheté ou marbré (figures 2.4.5 et 2.4.6). La taille moyenne de l'adulte est de 10 cm pour 12 g. La longévité est de 4-6 ans (Persat, 2001).

Cette espèce démersale affectionne particulièrement les eaux fraîches et turbulentes de la zone à truite à la zone à barbeau dans les rivières des régions tempérées. Territorial et sédentaire, il se tient caché dans des infractuosités dont il ne sort que la nuit. Il chasse à l'affût en aspirant les proies benthiques (annélides, mollusques, larves d'insectes) passant à sa portée.

Une fois l'âge de maturité atteint (environ 2 ans en moyenne, pour les deux sexes confondus), le chabot se reproduit en adaptant sa stratégie de reproduction au milieu dans lequel il se trouve (pondeur unique dans les rivières pauvres et pondeur multiple dans les rivières productives) (www.fishbase.org). Le mâle invite la femelle à coller leurs œufs (2.5mm de diamètre) en grappe au plafond de son abri. Il les protège et les ventile durant toute la durée de l'incubation (240°j).

2.4.2.2. Le goujon

Le goujon est un téléostéen benthopélagique appartenant à l'ordre des Cypriniformes et à la famille des Cyprinidés (www.fishbase.org ; Rosecchi et Kestemont, 2001). Sa taille moyenne est de 10-15 cm pour 20 g et sa coloration se traduit par un ventre blanc argenté, une tache sombre sur l'opercule et un corps généralement verdâtre, moucheté de brun sur le dos, les flancs et les nageoires (figures 2.4.7 et 2.4.8). Outre son corps allongé et son museau épais, il possède une bouche sub-terminale munie d'une paire de barbillons. La durée de vie de l'espèce est de 4-5 ans.

Ce poisson est généralement associé à la zone à barbeau. Il est également bien représenté dans la zone à ombre et à brème, mais peu dans la zone à truite. Il vit dans les eaux claires à fonds de graviers mais peut s'adapter à des milieux stagnants, à fonds vaseux et riches en matières organiques (lacs, canaux). Les individus fouisseurs se nourrissent de proies benthiques (larves d'insectes, crustacés, oligochètes, mollusques), mais aussi de cladocères et de copépodes.

La maturité sexuelle est atteinte vers 2 ans et la reproduction s'étend d'avril à juillet, avec un pic en mai-juin, lorsque la température dépasse les 15°C. Il s'agit d'une espèce à pontes multiples et fractionnées. Les œufs pondus par les femelles (1,2mm de diamètre) adhèrent fortement à toute une variété de substrats. La fécondité est variable et dépend

notamment de l'âge. Durant la période de frai, les mâles sont reconnaissables à leurs tubercules nuptiaux sur le front et les opercules.

2.4.2.3. La loche franche - *Barbatula barbatula* (Linnaeus, 1758)

La loche franche fait partie des Cypriniformes et de la famille des Balitoridae. La tête est large, les barbillons bien visibles et la nageoire caudale peu échancrée (figures 2.4.9 et 2.4.10). La couleur du corps est brun foncé avec des marbrures sombres, irrégulières, et le ventre rosé. Les nageoires impaires sont tachetées de noir et la naissance de la queue est souvent marquée par une bande foncée. La taille adulte n'excède pas 10-12 cm (Perrin, 2001).

La loche vit dans les eaux claires et fraîches de la zone à truite à la zone à barbeau. Cette espèce benthique tolère bien les fonds couverts d'algues et les milieux eutrophes pour autant qu'ils soient bien oxygénés. En effet, sensible à la pollution et au manque d'oxygène, la loche est souvent utilisée comme indicateur d'une bonne qualité d'eau (www.fishbase.org). Elle se cache sous les pierres et se nourrit de larves de chironomes, de gammares et d'autres invertébrés benthiques.

La reproduction se déroule d'avril à juin. Les œufs de 1mm sont pondus en plusieurs fois (pondeur multiple) sur des graviers, des mousses ou des plantes.

2.4.2.4. L'ombre - *Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758)

L'ombre fait partie des Salmoniformes et de la famille des salmonidés. La taille est de 35-45cm en moyenne. Ce poisson fusiforme possède une petite tête à museau fin, avec une bouche sub-infère armée de fines dents. La caractéristique principale de l'espèce est la longue et haute nageoire dorsale appelée « étendard » et qui, plus développée chez le mâle, sert à envelopper la femelle lors de l'accouplement. Dans nos régions, l'ombre est argenté avec généralement plusieurs dizaines de points noirs sur les flancs (figure 2.4.11) (Persat, 2001).

L'ombre est un poisson de type pélagique qui vit dans les grands courants plats de larges rivières (zone à ombre). Il préfère les eaux bien oxygénées et rapides (www.fishbase.org). Il se nourrit d'insectes et crustacés capturés sur le fond graveleux ou en dérive dans le courant.

Le frai débute en mars lorsque la température de l'eau atteint 9°C soit le plus souvent vers la fin mars début avril et s'étend sur 15 jours à un mois selon les variations de débit et de température. Les ombres remontent vers les frayères qui se situent dans des affluents où la profondeur est de 20-30cm sur les hauts fond de gravier en tête de radier. Après une cour quelque peu perturbée par les agressions des autres mâles, L'heureux élu s'accrole au flanc de la femelle et sa nageoire en drapeau entoure le corps de cette dernière. Tous deux s'enfoncent dans les graviers pour émettre œufs et laitance. La femelle retourne alors se reposer avant de s'accoupler à nouveau, souvent, avec le même mâle, parfois exactement à la même place. La maturité est atteinte vers 2 à 3 ans dans nos régions (www.fishbase.org).

2.5. Cours d'eau étudié

2.5.1. Evolution de l'état de la Vesdre jusqu'aujourd'hui

(résumé d'après D.Aublin et F.Varone, 2002)

Considérée autrefois comme l'une des rivières les plus poissonneuses de Belgique, la Vesdre (figures 2.5.1 et 2.5.2) a subi de graves pollutions depuis le 19^{ème} siècle et ce, jusqu'il y a peu. En effet, le bassin de la Vesdre est une vaste région dont 25% de la surface sont densément occupés par des habitations ainsi que des industries de production (acier, papier, produits chimiques alimentation et textiles), 43.9% sont représentés par des massifs forestiers et 32.1% sont utilisés pour l'agriculture. D'autres activités sont également présentes: tourisme, baignade, pêche sportive, sites de camping, etc.... Bien que relativement abondantes sur l'ensemble du bassin, la population et les activités anthropiques (notamment industrielles) sont inégalement réparties dans la région : elles se concentrent principalement dans un secteur allant d'Eupen à Liège. Les zonings industriels sont quant à eux essentiellement localisés aux alentours des villes d'Eupen, de Verviers et de Chaudfontaine. Toutes ces activités constituent des sources diffuses ou ponctuelles de pollution et représentent une menace non négligeable pour la rivière.

2.5.1.1. Origine de la pollution de la Vesdre

La pollution de la Vesdre est ancienne et remonte au 19^{ème} siècle, période durant laquelle l'activité industrielle de la région était intense : industries de laine à Verviers, métallurgies en aval... Des restes de cette pollution passée sont encore, en partie, présents aujourd'hui. En effet, de nombreux travaux montrent que la situation de la Vesdre pouvait être qualifiée de très grave au début des années 1980s, la pollution organique augmentant à partir d'Eupen et ne subissant qu'une très faible autoépuration en aval de la rivière. D'autres études montrent au cours de cette même période, de fortes pollutions de la Vesdre par des métaux lourds (cuivre, plomb, zinc, chrome, cadmium). Au début des années 1980s, les indices biotiques indiquent une pollution maximale (rivière eutrophisée) depuis Membach jusqu'à Vaux-sous-chèvremont, avec une faible récupération à Chenée.

La Vesdre entre Verviers et Pepinster est la section la plus polluée du cours d'eau, au vu de l'importante densité de population et d'industries que l'on trouve dans la région (figure 2.5.3). La répartition des types de pollution est de 55% d'effluents domestiques contre 45% de rejets d'origine industrielle.

Les problèmes majeurs concernant la qualité de l'eau de la Vesdre à cette époque se résument comme suit : une eutrophisation de la rivière depuis Eupen jusqu'à l'Ourthe, une pollution organique et une mauvaise qualité hydrobiologique en aval d'Eupen, ainsi qu'une aggravation générale de l'état de la Vesdre résultant de la longue histoire urbaine et industrielle de la région.

2.5.1.2. Amélioration de la qualité de la Vesdre

On constate une amélioration de l'état du cours d'eau entre 1986 et 1996 : la qualité physicochimique du cours inférieur de la Vesdre passe d'une qualité moyenne à bonne. La rivière passe d'un niveau d'eutrophisation eutrophe à méso-eutrophe en aval d'Eupen et à la confluence avec l'Ourthe. En aval de Spa, l'indice biotique global était mauvais entre 1985 et

1989 et atteint un niveau moyen en 2002. La pollution organique, quant à elle, reste cependant constante, c'est-à-dire modérée à forte.

Il existe trois causes principales à l'origine de l'amélioration de l'état écologique de la Vesdre :

A) Déclin de la pollution d'origine industrielle

En effet, les activités industrielles, principalement concentrées autour des villes d'Eupen, Verviers et Chaudfontaine, ont fortement décliné après les années 1980. Les rejets d'effluents industriels sont également plus faibles étant donné les normes imposées par la région afin de limiter les émissions de polluants. De plus, même si la plupart de grands volumes d'eaux usées industrielles sont toujours rejetés dans la rivière, une grande partie des consommateurs industriels d'eau possèdent leur propre système d'épuration et de traitement, ce qui améliore la qualité de l'eau usée avant son retour à la rivière. Les plus petits volumes sont, quant à eux, déversés dans un système d'égouts ou de collecteurs. Les rejets directs existent mais sont généralement liés à l'absence de collecteurs ou lorsque l'industrie se localise le long du cours d'eau.

B) Déclin de la pollution d'origine domestique

Entre 1981 et 1996, la diminution de la population du bassin contribue également à l'amélioration de la qualité de l'eau suite au déclin des rejets d'eaux usées et des pollutions liées au tourisme.

C) Installation et mise en fonction de trois STEP

Notons que la pollution domestique n'affecte pas la Vesdre sur tout son long car une grosse partie de ces rejets est déviée par un système de collecteurs construits dans les années 1950s. Le premier collecteur part d'Eupen et amène les eaux usées jusqu'à Membach. Les eaux usées de Limbourg et de Verviers aboutissent à Wegnez, en aval de Verviers par un second collecteur. Les eaux usées des communes de Spa, Thimister et Theux s'écoulent jusqu'à Goffontaine, en aval de Pepinster via un troisième collecteur qui se jette dans la Vesdre à cet endroit. Ainsi, Membach, Wegnez et Goffontaine sont des sources ponctuelles de pollution sur la Vesdre.

Heureusement, au cours des dernières années, trois grandes stations d'épuration furent mises en service, ce qui constitue une troisième cause de l'amélioration de la qualité de l'eau de la Vesdre. Cette fonction d'épuration et de purification est assurée par l'AIDE (Association Intercommunale de Démergement et d'Épuration) qui est responsable de l'entièreté du bassin. A Membach, la station d'épuration (capacité : 25.000 équivalent.habitant) est opérationnelle depuis 1998. L'usine d'épuration implantée à Wegnez (capacité : 170.000 éq.hab) est en fonctionnement depuis 2001. La station d'épuration de Goffontaine a été récemment mise en place (35.000 éq.hab) et est utilisée depuis 2004. Les problèmes de pollution domestique dans les régions urbaines sont donc en voie d'être résolus. Ainsi, cet aménagement réalisé sur la période 1998-2004 fut favorable à la restauration de la qualité de l'eau et au rétablissement de certains peuplements pisciaires jusqu'alors pratiquement éteints dans cette section de la Vesdre (Philippart, 2004). En effet, les phénomènes de pollution en aval de Verviers, dont notamment le problème de l'eutrophisation, rendaient difficile, voire impossible, la vie de certaines espèces de poisson, ce qui contribuait, du point de vue récréatif, à la diminution de l'activité de pêche sportive. Cependant, depuis la moitié des années 1990, le poisson revient

dans la Vesdre : d'après Philippart (2004), des pêches électriques réalisées en 2000-2003 sur la Vesdre ont permis de capturer 24 espèces de poissons, réparties en 9 familles (tableau 2.5.4). Parmi elles, des espèces exigeantes comme la truite commune et l'ombre commun. On note aussi la présence du chabot et du saumon atlantique, deux espèces à statut Natura 2000. Philippart et ses collaborateurs (2003) ont observés une évolution de la faune ichtyologique de 1978 à 2003, notamment une augmentation de la richesse en espèces indigènes, au sein de différentes stations de la Vesdre (tableau 2.5.5). Cette observation traduit une amélioration générale de l'état écologique de la rivière. D'une manière générale, cette renaissance biologique de la Vesdre, morte sur le plan ichtyologique durant les années 1970, démontre l'incroyable capacité des écosystèmes aquatiques à se régénérer naturellement, dès que cessent les formes graves de pollution et que des mesures adéquates de réduction des rejets et d'épuration d'eaux usées sont prises.

3.1. Echantillonnage sur le terrain

3.1.1. Echantillonnage des communautés pisciaires

Les poissons ont été échantillonnés aux différentes stations par la technique de la pêche électrique à pied. Un générateur (groupe électrogène DEKA) a été utilisé afin de produire un courant redressé de 300 à 600 volts et possédant une intensité de 2 à 6 ampères. Un seul passage sur un secteur d'environ 100m était réalisé à chacune des stations car il ne s'agissait pas de pêches d'inventaires. En effet, les pêches concernaient principalement la capture des 4 espèces sentinelles considérées (le chabot, la loche franche, l'ombre et le goujon). Tout poisson capturé, autre que ces espèces d'intérêt, était immédiatement remis à l'eau. Les poissons, une fois sous l'influence du champ électrique émis par l'anode, étaient facilement capturés (nage forcée suivie du phénomène d'électronarcose) à l'aide d'une épuisette et placés dans un bac de stockage en attendant d'être observés ou disséqués. Ils ont ensuite été pesés au dixième de gramme et mesurés (longueur totale en mm) à l'aide d'une règle à butée.

Le choix des stations de prélèvements était basé sur la présence de rejets de station d'épuration (STEP) dont le contenu, bien que fort variable d'une région à l'autre, peut concentrer divers EDCs susceptibles de se retrouver dans l'eau et de se répandre sur une plus ou moins longue portion de la rivière. Les stations échantillonnées étaient au nombre de quatre (figures 3.1.1., 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4, 3.1.5, 3.1.6) : deux stations localisées en amont des effluents des STEP de Wegnez et de Goffontaine, et les deux autres, en aval de chacun de ces rejets. De cette manière, des comparaisons pourront être réalisées entre l'aval et l'amont de chaque effluent afin d'en évaluer l'impact sur les poissons exposés, et ce à divers moments de l'année puisque 4 campagnes de pêches (fin octobre ; fin mars ; fin avril ; fin mai) ont été effectuées (tableau 3.1.7). Cet échantillonnage dans le temps permettra également d'obtenir des données physiologiques recouvrant une grande partie, voire l'entièreté du cycle reproducteur de chaque espèce, supposant que certains stades de maturation pourraient se révéler plus sensibles que d'autres à l'exposition aux effluents de STEP.

3.2.2. Prélèvements du matériel biologique d'étude

Plasma sanguin : La prise de sang est un prélèvement nécessaire à l'obtention de plasma qui sera ensuite utilisé pour les dosages de la vitellogénine et des stéroïdes sexuels. Une fois capturés, les poissons étaient légèrement assommés plutôt qu'anesthésiés chimiquement, et ce, par soucis d'une éventuelle perturbation provoquée par l'anesthésiant, notamment au niveau des activités enzymatiques. Le prélèvement était réalisé à l'aide d'une seringue de 1 ml couplée à une aiguille adaptée à la taille du poisson (0,5mm). La seringue était préalablement héparinée (héparine 25000 unités/ml) ou citratée dans le cas des goujons (citrate de sodium : 1g par 10mL⁻¹ d'eau distillée) afin d'éviter tout phénomène de coagulation durant la manipulation. Le sang a été récolté dans la portion de la veine caudale située en arrière de la nageoire anale et le long de la colonne vertébrale (figure 3.1.8). A l'endroit de la prise de sang, les écailles étaient délicatement retirées avec la pointe de l'aiguille afin d'en éviter l'obstruction, ce qui empêcherait l'aspiration du sang dans la seringue. Le sang prélevé (généralement entre 0,1 et 0,3 mL) a ensuite été placé dans un eppendorf annoté, hépariné (ou citraté) et disposé au frais dans de la glace (4°C). De retour au laboratoire, le sang a été centrifugé pendant 15 minutes à 3500 RPM (4°C). Le surnageant (plasma) fut récupéré dans un nouvel eppendorf annoté et placé au congélateur à -20°C.

Foie : Après la prise de sang, le poisson était assommé puis sacrifié. En effet, une incision de la colonne vertébrale à l'aide d'un scalpel ou de ciseaux était pratiquée au niveau de la nuque, en arrière des opercules, ce qui a pour conséquence de provoquer la mort instantanée du poisson par rupture de la moelle épinière. L'abdomen du poisson était incisé à partir de l'orifice uro-génital jusqu'à la tête (figure 3.1.9) et les divers organes d'intérêt étaient alors prélevés. Il était important de commencer immédiatement la dissection du foie. Cet organe était prélevé pour un dosage ultérieur de l'activité enzymatique EROD. La dissection du foie nécessitait une certaine rapidité ainsi qu'une réalisation sur glace afin d'éviter la détérioration du tissu et des activités enzymatiques présentes. L'organe devait être soigneusement prélevé, en prenant la précaution de ne pas sectionner la vésicule biliaire, la rate et les intestins dont les contenus pourraient interférer avec les enzymes hépatiques étudiées. Le foie était ensuite rincé au KCl 150mM, placé dans un cryotube et stocké dans une cuve d'azote liquide avant d'être placé au congélateur à -80°C . Les foies ont ensuite été confiés à l'Université de Liège (Laboratoire d'Ecologie Aquatique et d'Ecotoxicologie, Prof. J. P. Thomé) pour les dosages EROD.

Gonades : Les gonades ont également été prélevées. L'une fut placée dans de la glace, et de retour au laboratoire, pesée au millième de gramme afin de calculer le Rapport Gonado-Somatique (RGS, calculé comme le rapport entre le poids des organes sexuels et celui du reste du corps, le tout multiplié par 100), puis placée dans un pilulier étanche rempli de liquide de Bouin. Ce dernier est un agent fixateur empêchant la détérioration des tissus qui seront utilisés ultérieurement pour l'étude histopathologique. L'autre gonade fut placée dans la cuve d'azote liquide puis dans le congélateur à -80°C dès notre retour au laboratoire, et ce pour les conserver jusqu'à la réalisation des dosages de l'activité aromatase.

Carcasses : Les carcasses de poissons ont été conservées dans de la glace et transportées à l'Université de Liège (Laboratoire d'Ecologie Aquatique et d'Ecotoxicologie, Prof. J. P. Thomé) pour dosage de PCBs dans les muscles.

3.2. Méthodes d'analyses biochimiques

3.2.1. Dosage de l'activité EROD

L'activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase a été mesurée par le LEAE (Laboratoire d'Ecologie Aquatique et d'Ecotoxicologie, ULg). Le principe du dosage est basé sur la dé-éthylation de la 7-éthoxy-O-résorufine en hydroxylrésorufine dont la fluorescence est mesurée par spectrophotométrie. Le protocole de dosage se trouve en annexe 1.

3.2.2. Dosage de la vitellogénine par la méthode de l'ALP

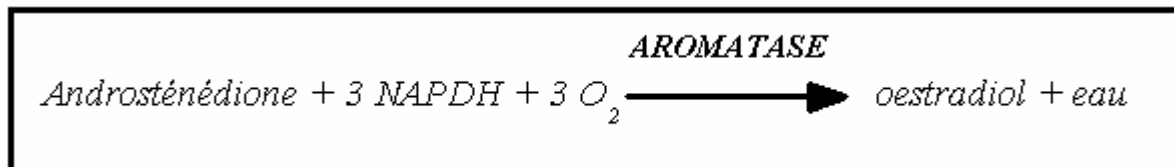
La vitellogénine et la vitelline sont des composés lipo-phosphoprotéiques. Les phosphates qu'ils contiennent sont sous forme libre en milieu alcalin et peuvent être déterminés par spectrophotométrie (méthode « phosphomolybdate »). La concentration en phosphate alcalin libre (ALP) est un indicateur indirect du taux de vitellogénine ou de vitelline car la corrélation avec la mesure de la vitellogénine effectuée par utilisation d'anticorps spécifiques est très élevée ($> 95\%$). De plus, pour la plupart des vertébrés, la vitellogénine contient environ 1,4% de phosphore.

Les principales étapes du dosage (modifiés d'après Lowry), sont les suivantes : après précipitation des protéines plasmatiques par du TCA 20% (acide trichloroacétique dans de l'eau distillée), les culots sont lavés avec différents solvants organiques (éthanol absolu, chloroforme, acétone et diéther). Après séchage des culots contenant essentiellement les protéines, une solution alcaline est ajoutée aux échantillons afin de libérer les phosphates des lipo-phosphoprotéines. Enfin, les réactifs nécessaires aux mesures spectrophotométriques, c'est-à-dire le phosphomolybdate et le réducteur, sont ajoutés à la préparation. L'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 660nm. Le contenu en phosphates pour chaque cuvette est déterminé en faisant référence à l'absorbance des dilutions standard préalablement réalisées (courbe d'étalonnage). Ensuite, pour chaque échantillon, la concentration réelle en phosphates (et donc indirectement en vitellogénine) plasmatiques est alors calculée en tenant compte des dilutions effectuées à partir du plasma initial.

Notons que les mesures ont été réalisées en duplicata. L'intégralité du protocole se trouve en annexe 2.

3.2.3. Dosage de l'activité aromatase par radiométrie

Pour rappel, l'aromatase est une enzyme de transformation d'androgènes aromatisables en œstrogènes. La réaction est équimolaire et se caractérise par la consommation de trois molécules de NADPH et d'oxygène pour chaque molécule d'œstrogène produite. Une molécule d'eau est également libérée.



Le dosage de l'activité aromatase se réalise par radiométrie. En effet, au départ de la manipulation, un substrat radioactif aromatisable, la $1\beta^3\text{H}$ -androsténédione, est utilisé. L'évaluation spécifique de l'activité de l'enzyme peut ainsi être obtenue grâce à la mesure de la radioactivité transférée du substrat à l'eau produite, et en exprimant cette production d'eau tritiée par unité de protéines et de temps.

Le protocole de dosage de l'aromatase est disponible en annexe 3.

3.2.4. Dosage des stéroïdes sexuels plasmatiques

Ce dosage a été effectué par une méthode radioimmunologique (Radioimmunoassay : RIA) et concerne les stéroïdes suivants : 11-kétotestostérone, testostérone et 17β -œstradiol. Le principe du dosage est basé sur la compétition entre une hormone marquée (H^*) grâce à un isotope radioactif (H^3) et une hormone froide (H°) de concentration connue (standard) ou inconnue (échantillons), vis-à-vis d'un anticorps spécifique (As). Dans un premier temps, l'hormone froide est mise en contact avec l'anticorps spécifique. Elle se trouve ainsi sous deux formes : libre ou liée. On ajoute ensuite l'hormone marquée. La quantité d'anticorps et d'hormone marquée reste constante. Toute augmentation de la concentration en hormone froide entraîne une réduction du taux de fixation de l'hormone marquée. Par la suite, on sépare l'hormone marquée complexée à l'anticorps de l'hormone marquée libre. Il est dès lors possible de mesurer la radioactivité de l'une de ces deux fractions et d'en déduire la concentration en hormone froide présente dans l'échantillon. L'établissement d'une courbe

standard permet de caractériser la décroissance du pourcentage d'hormone marquée qui se fixe à l'anticorps en présence d'une quantité connue et progressivement croissante d'hormone froide.

Les stéroïdes sexuels doivent d'abord subir une double extraction qui permet de produire une rupture des liaisons hormones-protéine. Ensuite, on effectuera la compétition entre l'hormone froide (standard et échantillons) et l'hormone marquée vis-à-vis de l'anticorps. Après une incubation de 12 heures à 4°C, la séparation entre l'hormone marquée libre et l'hormone marquée complexée à l'anticorps se fait par centrifugation, décantation et rinçage. La dernière partie du dosage consiste à mesurer la radioactivité émise par chacun des tubes (cpm). Cette mesure est effectuée par un compteur β (BECKMAN LS 6000IC). Une régression multiple basée sur le pourcentage de liaison (B/B_0 en %), le pourcentage total de traceur (hormone marquée) lié à l'anticorps en l'absence d'hormone froide (B_0), la radioactivité spécifique ou naturelle (background), et la courbe de calibrage, permet de transformer les valeurs, mesurées en cpm, et de les exprimer en pg/tube. La quantité réelle d'hormone présente dans l'échantillon de plasma se calcule ensuite en tenant compte des dilutions effectuées à partir du plasma initial.

Notons que les mesures ont été réalisées en duplicata pour chaque échantillon et standard. De plus, pour chaque hormone, on réalise une mesure de la radioactivité naturelle (background) et une mesure de la fixation totale.

L'intégralité du protocole se trouve en annexe 4.

3.3. Méthodes d'analyses histologiques

3.3.1. Manipulation des gonades

Une fois la gonade pesée, un morceau (1cm) a été prélevé. Afin d'éviter les problèmes liés aux distributions hétérogènes des ovocytes et des cellules spermatogéniques en périphérie des gonades, le tissu utilisé pour cette analyse a toujours été prélevé dans la partie centrale de l'organe. Ensuite, le tissu a été placé dans un pilulier étanche contenant du Bouin, un liquide fixateur durant un minimum de 24 heures. Cette étape est absolument nécessaire afin d'éviter une autolyse des tissus ainsi que la prolifération de germes et de bactéries responsables de la putréfaction, phénomènes destructeurs se produisant inévitablement suite à la mort d'un organisme vivant. La quantité de fixateur à utiliser dépend de la température de la pièce, de l'épaisseur du tissu et du type d'organe étudié. Dans le cadre de ce travail, le volume de fixateur utilisé était en moyenne 20 fois plus important que le volume de l'échantillon.

Les coupes et colorations ont été réalisées en collaboration avec le département d'histologie-embryologie (Prof. Y. Poumay, FUNDP). La réalisation des lames histologiques peut être résumée en 7 étapes :

- *La déshydratation et l'imprégnation en paraffine.*
- *L'enrobage des gonades avec de la paraffine à 58°C.*
- *Le dégrossissage et le ramollissement.*

- **La coupe des blocs de paraffine au microtome** (Leica RM2145). Les ovaires sont coupés à 4 μm et les testicules à 3 μm , épaisseurs idéales pour l'observation d'une couche de cellules au sein de chaque organe.
-
- **L'étalement des tissus sur des lames « Superfrost ».**
- **La coloration des lames.** Les testicules sont colorés par un trichrome à chaud (hématoxyline de Regaud à 57° - solution de rouge – vert lumière) tandis que les ovaires subissent un trichrome à froid (bleu de Célestin, hémalun – phloxine – vert lumière). Dans les deux cas, il s'agit d'une coloration régressive c'est-à-dire que l'on colore les tissus par une coloration excessive et que, par la suite, un différenciateur retire l'excès de ce premier colorant fixé sur des structures non concernées, de manière à permettre la pénétration d'un second colorant.
Le bleu de Célestin et l'hémalun colorent les noyaux des ovocytes en bleu foncé et l'hématoxyline de Regaud colore les noyaux des cellules germinales mâles en noir. La phloxine, utilisée pour la coloration des ovaires colore les protéines en rouge et notamment la vitellogénine. La solution de rouge colore le cytoplasme des cellules germinales mâles en rouge. Le vert lumière est utilisé pour la coloration des tissus conjonctifs en vert.
- **Le montage :** il consiste en l'ajout de DPX sur la lame colorée et le recouvrement de celle-ci par une lame couvre-objet.

L'entièreté du protocole se trouve en annexe 5.

3.3.2. Analyse des coupes histologiques

3.3.2.1. Histopathologie des testicules

Pour des raisons pratiques, les coupes des testicules ont été analysées de manière qualitative. Bien que la spermatogenèse soit un processus continu, divers stades de maturité ont été définis (figures 3.3.1 et 3.3.2 ; encadré 3.3.3) afin de déterminer le degré de développement des testicules de poissons capturés dans les 4 stations à différents moments de l'année. Pour chaque individu, l'évaluation des stades les plus matures atteints ainsi que la présence d'intersexe ont été effectuées.

Encadré 3.3.3. Aspects morphologiques de la spermatogenèse chez le goujon (Kestemont, 1989):

- **Les spermatogonies A** (Spg A) : cellules de grande taille plus ou moins isolées, dont le noyau (9-13 μm) est d'apparence claire après coloration à l'hématoxyline ; la chromatine y est disposée sur le pourtour.
- **Les spermatogonies B** (Spg B) : cellules de petite taille, groupées en cystes, possédant un noyau et un cytoplasme plus intensément colorés que les Spg A. Le noyau (7-9 μm) présente un nucléole fort marqué.
- **Les spermatocytes** (noyau de 5-7 μm) : cellules regroupant les spermatocytes I et les différents stades de transformation jusqu'au spermatocyte II. Les stades zygotène (Spc Z) (accouplement longitudinal des chromosomes homologues, avec image en parapluie) et pachytène (Spc P) (chromatine condensée en paquets) sont facilement reconnaissables.
- **Les spermatides** (Spd) : cellules possédant un noyau de petite taille (3 μm) très caractéristique.
- **Les spermatozoïdes** (Spz) : cellules fortement colorables à l'hématoxyline de Regaud et disposées dans la lumière des lobules et des canaux déférents.

3.3.2.2. Histopathologie des ovaires

Les coupes des ovaires ont été analysées de manière quantitative. Bien que l'ovogenèse soit également un processus continu, elle peut être divisée en quatre grandes étapes : la croissance protoplasmique de l'ovocyte, la vitellogenèse endogène (appelée également prévitellogenèse ou stade des alvéoles corticales), la vitellogenèse exogène et la maturation finale (Rinchard *et al.*, 1998). Divers stades de développement peuvent ainsi être observés (tableau 3.3.4. et photos).

Pour chaque lame, les proportions des différents stades ovocytaires ont été mesurées. En effet, en parcourant la coupe de façon aléatoire, 100 ovocytes ont été dénombrés afin d'évaluer les proportions apparentes des divers stades présentés précédemment.

Chaque ovaire a été ensuite classé selon le stade ovocytaire le plus avancé rencontré au sein de la masse ovocytaire. Le diamètre moyen des ovocytes les plus avancés a été calculé (excepté pour les ovules et les follicules atreétiques) sur base de 15 mesures de diamètres effectuées au sein de la coupe à l'aide d'un objectif gradué et d'une lame de calibration. Cependant, étant donné que la plupart des ovocytes ne sont pas totalement sphériques, mais plutôt de forme ovale, le diamètre de chacun d'eux a été calculé en considérant la mesure du diamètre le plus grand, du diamètre le plus petit, et en effectuant une moyenne des deux valeurs.

Notons que dans le cas des ovaires, seuls les ovocytes présentant un noyau bien visible en position centrale (sauf en ce qui concerne les stades de migration du noyau (appelé également vésicule germinative) et de GVBD (Germinal Vesicle BreakDown) pour lequel il se trouve en périphérie) ont été considérés afin d'éviter des erreurs lors de la détermination du stade et de la mesure du diamètre.

3.4. Analyses statistiques

Etant donné que l'étude a été réalisée sur deux stations d'épuration (STEP) distinctes, les résultats obtenus à Goffontaine et Wegnez ont été analysés séparément. De plus, pour chaque STEP, chaque espèce a fait l'objet d'un traitement statistique individuel. Remarquons également que les différents paramètres de la reproduction mesurés au cours de cette étude dépendent naturellement du sexe des individus. Il semble donc évident qu'une analyse séparée des mâles et des femelles s'impose dans le cadre de ce travail.

Pour des raisons pratiques lors de la présentation des résultats, les dates des pêches seront représentées par les différentes campagnes de prélèvement (tableau 3.1.7).

Les données concernant le RGS, la vitellogénine, l'activité aromatasase, les stéroïdes sexuels, et le diamètre moyen du stade ovocytaire le plus avancé ont été traités en ANOVA à 2 critères de classification croisés, soit le site (« amont » ou « aval ») et la campagne. Chaque jeu de données a premièrement été confronté au test de normalité de la variable métrique, soit le test de Kolmogorov-Smirnov ou test de K-S. La distribution des données est dite « normale » lorsque le test de K-S est non significatif ($p > 0,05$). Lorsque la normalité n'était pas établie, une transformation de variable ($\text{LOG}(x + 1)$; racine carrée ; $\text{LN}(x+1)$) a été effectuée. Un deuxième test précède l'ANOVA 2 proprement dite, il s'agit du test d'homoscédasticité des variances. Le test de Bartlett a été réalisé à cette fin. Selon Vorapongsathorn et ses collaborateurs (2004), le test de Bartlett possède une puissance élevée dans bon nombre de cas et constitue un test précis, à condition que la condition de normalité des variables considérées soit satisfaite. De plus, le test ne nécessite pas un nombre identique

d'individus pour chaque échantillon. Toutefois, lorsque le test de Bartlett n'approuvait pas l'homogénéité des variances, soit dans le cas d'un test significatif ($p < 0,05$), le test de Levene, moins restrictif, a été utilisé. Ensuite, l'ANOVA 2 a été effectuée sur les divers jeux de données, afin de tester l'effet individuel des deux facteurs étudiés ainsi que leur interaction. Lorsque l'ANOVA 2 révélait un effet significatif ($p < 0,05$), un test Post-Hoc HSD de Tukey pour échantillons à effectifs inégaux a été réalisé pour mettre précisément en évidence les sites et/ou les campagnes qui différaient dans le jeu de données. Toutefois, les contraintes liées à l'environnement et aux conditions d'expérimentation n'ont pas permis d'obtenir un plan d'échantillonnage équilibré. En effet, pour certaines campagnes, on remarque l'absence de résultats pour l'un ou l'autre des deux sites considérés (« amont » ou « aval »). Dès lors, la réalisation de l'ANOVA 2 nécessitait la suppression des campagnes incomplètes pour l'analyse des données.

Les résultats des proportions des différents stades ovocytaires et de la proportion d'atrésie préovulatoire rencontrée chez les individus femelles ont été analysés à l'aide d'un test de Khi-carré (χ^2), test de comparaison de fréquences ou de proportions. Lorsque le χ^2 calculé était plus élevé que le χ^2 théorique, le test se révélait significatif, et les proportions pouvaient être qualifiées de différentes.

Les données EROD obtenues par l'ULg correspondant à des moyennes par site et par campagne, et non à des résultats individuels, aucun traitement statistique n'a été réalisé sur ce jeu de données. Une visualisation graphique permettra d'en dégager les tendances sans toutefois pouvoir affirmer ou infirmer précisément ces observations sur une base statistique.

Les traitements statistiques ont été réalisés sur le logiciel « STATISTICA » et « EXCEL ».

4.1. Introduction

Les pêches électriques réalisées en début de notre étude n'ont pas permis d'obtenir un plan d'échantillonnage complet (tableau 4.1.1). En effet, si deux de nos espèces considérées (goujon et loche) ont pu être échantillonnées pour la plupart ou la totalité des sites et des campagnes, il n'en est rien de l'ombre et du chabot. L'ombre n'a pu être capturé qu'en « aval » de Wegnez et ce pour une seule campagne. De même, les chabots n'ont pu être échantillonnés qu'en « amont » de Goffontaine et en « aval » de Wegnez pour les différentes campagnes. Or, l'objectif de cette étude étant d'évaluer les éventuelles différences entre les sites « amont » et « aval » pour chacune des deux stations d'épuration (STEP), l'utilisation des données concernant ces deux espèces s'avère peu intéressante à cette fin. En conclusion, les résultats des goujons et des loches seront les seuls pris en compte pour notre étude.

4.2. Paramètres morphologiques et histologiques

4.2.1. Rapport Gonado-Somatique ou RGS (figure 4.2.1.1)

A) Les goujons femelles

A **Goffontaine** : Comme attendu, on observe globalement une augmentation du RGS dans le temps, tous sites confondus. En effet, le RGS augmente de 6,11% en novembre (période de repos sexuel) (C1) à 16,6% vers la fin mai (période de reproduction) (C4). Il ne semble pas y avoir de différence entre les sites « amont » et « aval » pour la campagne C3 (début mai) alors qu'en C4 (fin mai), le RGS calculé en « aval » est légèrement plus élevé qu'en « amont ». L'ANOVA 2 ne montre cependant aucun effet significatif ($p > 0,05$) du site (« amont » ou « aval »), de la campagne, ou de leur interaction. Rappelons que l'analyse statistique effectuée pour les goujons femelles à Goffontaine ne concerne que les campagnes C3 et C4, dont l'échantillonnage était complet.

A **Wegnez** : L'augmentation de RGS dans le temps s'observe également pour le site « aval », de 5,56% en novembre (C1) à 13,43% vers la fin mai (C4). En « amont », aucune tendance similaire n'est observable. Toutefois, il faut émettre une réserve lors de l'interprétation de ces résultats « amont » : en effet, les campagnes C2 (fin mars) et C3 (fin avril) ne sont représentées que par un seul individu. Vers la fin mars (C2), pour le site « amont », le RGS des goujons femelles est plus élevé que celui des poissons capturés en « aval ». Mais ici encore, la prudence est de rigueur puisque le site « amont » de la campagne C2 n'est représenté que par un seul individu. En « aval », le RGS est légèrement supérieur à celui de l'« amont » en C4. L'ANOVA 2, réalisée sur les campagnes C2 et C4, ne montre cependant aucun effet significatif pour aucun des deux facteurs, ni pour leur interaction.

B) Les goujons mâles

A **Goffontaine** : Le RGS augmente très faiblement (de 1,06% à 1,63-1,82%) entre les campagnes C1 (novembre) et C3 (fin avril), toutes stations confondues, pour finalement se stabiliser en C4 (fin mai). L'augmentation du RGS est beaucoup moins marquée que chez les femelles. En ce qui concerne la comparaison entre sites, le RGS semble être légèrement plus élevé en « aval », par rapport à l'« amont », pour les campagnes C3 et C4. L'ANOVA 2,

effectuée sur les campagnes complètes (C3 et C4) n'indique cependant aucun effet significatif du site, de la campagne, ou de leur interaction.

A Wegnez : Le RGS augmente globalement (de 0,94% à 2,24%) entre la campagne C1 (novembre) et C2 (fin mars), valeur à laquelle il se stabilise jusque fin avril. Fin mai (C4), le RGS diminue aux environs de 1,5 %, aussi bien en « amont » qu'en « aval ». L'observation du graphique montre que le site « aval » présente un RGS plus faible que celui rencontré en « amont » vers la fin mars (C2) mais la tendance observée s'inverse vers la fin mai (C4). L'ANOVA 2 réalisée sur trois campagnes (C2, C3, C4) ne montre pas d'effet significatif du site, ni de l'interaction site - campagne. Par contre, il existe un effet significatif ($p = 0.010971$) de l'effet campagne. Le test Post-Hoc révèle que les campagnes C3 et C4 sont différentes, toutes stations confondues.

C) Les loches femelles

A Goffontaine : Pour le site « amont », le RGS augmente (de 14% à 19,86%) entre C1 (novembre) et C2 (fin mars) puis décline jusque 11,27% en C4 (fin mai). Pour le site « aval », les différences ne se marquent que très peu, le RGS se situant toujours entre 9,79-12,63%. Le graphique montre clairement les différences existant entre les sites « amont » et « aval » pour les campagnes C1 (novembre), C2 (fin mars) et C3 (fin avril), le site « amont » présentant un RGS plus élevé. Par contre, il semble n'y avoir que très peu de différence entre les deux sites pour la campagne C4 (fin mai), où le RGS calculé en « aval » semble légèrement plus élevé qu'en « amont ». L'ANOVA 2 réalisée sur les 4 campagnes indique une différence significative entre les deux sites ($p = 0.033$), toutes campagnes confondues, le RGS étant globalement plus faible en « aval ». Elle ne révèle pas d'effet significatif de la campagne ou de l'interaction site - campagne. Il faut toutefois noter que le RGS varie fortement entre femelles pour une même date et un même site.

A Wegnez : Le RGS augmente globalement depuis novembre (C1), où il atteignait 10,83%, jusqu'à la fin mars (C2), où le RGS vaut 18,73%. Ensuite, un léger déclin du RGS, aux alentours de 15-17% se produit jusqu'à la fin mai (C4). Les sites « amont » présente un RGS plus élevé qu'en « aval », pour les campagnes C3 (fin avril) et C4 (fin mai). L'ANOVA 2 réalisée sur les campagnes C3 et C4 n'indique cependant aucun effet significatif du site, de la campagne, ou de l'interaction site – campagne, les différences individuelles étant généralement importantes.

D) Les loches mâles

A Goffontaine : Pour la station « aval », le RGS diminue de moitié de C1 (novembre) jusqu'en C3 (fin avril), atteignant des valeurs proches de 0,8%. Les variations individuelles sont très élevées en C1. En « amont », les variations de RGS sont moins marquées. Une différence entre les deux sites est observable pour les campagnes C1 et C2, pour lesquelles le RGS en « aval » est plus élevé. Par contre, le RGS calculé en « amont » est plus élevé qu'au site « aval » pour la campagne C3. La différence entre sites en C4 (fin mai) est peu marquée, bien que le RGS soit plus élevé pour le site « aval ». L'ANOVA 2 effectuée sur les 4 campagnes, ne montre aucun effet significatif du site, de la campagne et de l'interaction site - campagne.

A Wegnez : Le RGS diminue de la même façon aux deux sites, présentant une valeur plus faible en C3 (fin avril) (0,54% en « aval » et 0,88% en « amont ») pour augmenter par la

suite jusqu'en C4 (fin mai) (0,89% en « aval » et 1,09% en « amont »). Globalement, pour les campagnes C3 et C4, le RGS du site « aval » est plus faible que le RGS calculé pour le site « amont ». L'ANOVA 2 réalisée sur ces deux campagnes complètes ne révèle toutefois aucun effet significatif du site, de la campagne ou de leur interaction.

4.2.2. Histologie des gonades

4.2.2.1. Maturation et croissance ovocytaire (figures 4.2.2.1, 4.2.2.2 et 4.2.2.3)

Pour rappel, la maturation ovocytaire a été évaluée par observation des différents stades présents dans les ovaires de goujons et de loches ainsi que par une estimation des proportions relatives de ces différents stades. La croissance ovocytaire s'est focalisée sur la variation du diamètre moyen du stade le plus avancé dans l'ovaire. Il se base donc sur des mesures de diamètre effectuées sur des ovocytes qui peuvent se situer, selon les espèces, les campagnes et les sites d'échantillonnage, à des stades de maturation différents.

A) Les goujons femelles

A Goffontaine : Globalement, on peut remarquer une évolution dans le temps des différentes proportions d'ovocytes. Notamment, en « aval » de Goffontaine, on remarque une augmentation (de 0% à 19,1%) de la proportion d'ovocytes en vitellogenèse exogène jusque fin avril (C3) aux dépens des autres stades. En C4, la proportion d'ovocytes en vitellogenèse exogène chute et l'apparition de follicules post-ovulatoires signale que des pontes ont déjà eu lieu. En « amont », par contre, entre fin mars (C2) et fin avril (C3), la proportion de stade protoplasmique croît (de 58,37% à 74,99%) alors que les proportions d'ovocytes au stade d'alvéoles corticaux précoces et avancés déclinent légèrement. Par contre la quantité d'ovocytes en vitellogenèse exogène ne change pratiquement pas entre les deux dates (environ 10%). Toutefois entre C3 et C4, les deux stades d'alvéoles corticaux augmentent faiblement. On note également l'apparition de follicules atrétiques pré-ovulatoires (3,92%). Le test de χ^2 réalisé individuellement pour les campagnes C3 et C4 a permis de mettre en évidence une différence entre les sites « amont » et « aval » pour la campagne de fin avril (C3) ($\chi^2_{\text{observé}} = 15,86$ et $\chi^2_{\text{table}} = 12,60$). En effet, en « aval » de Goffontaine, les ovaires contiennent beaucoup moins d'ovocytes protoplasmiques (48,62% au lieu de 74,99%) alors que les proportions des autres stades sont doublées, ce qui témoigne d'une maturation plus avancée : 19,1% d'ovocytes en vitellogenèse exogène, 12,9% d'ovocytes au stade d'alvéoles corticaux avancés et environ 19,05% au stade d'alvéoles corticaux précoces.

Tous sites confondus, le diamètre du stade ovocytaire le plus avancé augmente de 0,63mm à près de 1,19mm entre les campagne de novembre (C1) et de fin avril (C3), puis diminue jusqu'en C4 (fin mai), avoisinant 0,96mm. Les valeurs de diamètres entre les sites « amont » et « aval » ne semblent pas différentes pour les campagnes de fin avril (C3) et de fin mai (C4). L'ANOVA 2 réalisée sur ces deux dernières campagnes ne montre pas d'effet du site, ni de l'interaction site – campagne. Elle révèle par contre un effet campagne significatif ($p = 0,0093$), la campagne de fin avril (C3) présentant des diamètres ovocytaires plus élevés qu'en fin mai, tous sites confondus.

A Wegnez : Pour le site « aval », on constate une diminution progressive des ovocytes protoplasmiques au détriment de stades plus avancés (alvéoles corticaux précoces et avancés) jusqu'en fin mars (C2). Vers la fin mai (C4), les ovocytes en vitellogenèse exogène occupent 18% du tissu ovarien. En « amont », les stades d'alvéoles corticaux précoces et avancés occupent environ 50% de l'ovaire vers la fin mars (C2). Vers la fin avril (C3), cette

proportion chute aux dépens d'ovocytes en vitellogenèse exogène et d'ovocytes protoplasmiques. Vers la fin mai (C4), le stade protoplasmique augmente jusqu'à 75,88%. Le test de χ^2 réalisé pour les campagnes C2 et C4 n'a révélé aucune différence entre les sites.

En ce qui concerne la croissance ovocytaire, une évolution semblable à celle rencontrée à Goffontaine est observable, bien qu'un peu moins nette. Les ovocytes augmentent de taille entre novembre (C1) et fin mars (C2), passant de 0,72mm à 0,99mm ou plus. Vers la fin mai (C4), on constate une différence entre les diamètres ovocytaires rencontrés en « amont » et en « aval », ce dernier site présentant une valeur moyenne de près de 1,03mm alors qu'en « amont », le diamètre moyen observé était de 0,92mm. Vers la fin mars (C2), par contre, le diamètre rencontré en « amont » est plus important qu'en « aval ». Cependant, un seul individu représente le site « amont » pour la campagne de fin mars. L'ANOVA 2 effectuée sur les campagnes C2 et C4 ne montre aucun effet du site, de la campagne ou de leur interaction.

B) Les loches femelles

A Goffontaine : Globalement, entre novembre (C1) et fin avril (C3), les proportions évoluent avec une augmentation du stade de vitellogenèse exogène aux dépens de la quantité d'ovocytes protoplasmiques. On constate également l'apparition de follicules atrétiques post-ovulatoires pour le site « aval » vers la fin avril (C3), signes de pontes récentes, de même que l'apparition de follicules atrétiques pré-ovulatoires (9,6%). Le test de χ^2 ne révèle pas de différence entre les deux sites, et ce pour aucune des quatre campagnes.

Le diamètre du stade ovocytaire le plus avancé augmente entre novembre (C1) et fin avril (C3), respectivement de 0,77mm à 0,99mm en «amont» et de 0,72 à 0,84mm en «aval». Vers la fin mai (C4), pour les deux sites, la valeur de diamètre se situe aux alentours de 0,69mm. En ce qui concerne la différence entre sites, le diamètre moyen est légèrement plus faible en « aval » par rapport à l'« amont » pour les trois premières campagnes. Vers la fin mai, il n'y a, par contre, pas de différences entre les deux sites. L'ANOVA 2 réalisée sur les quatre campagnes montre un effet significatif du site ($p = 0,034$) et de la campagne ($p < 0,0001$), mais pas de leur interaction. Le diamètre moyen observé en «amont», toutes campagnes confondues, est plus élevé qu'en «aval». L'effet campagne indique une différence entre C1 (novembre) et C2 (fin mars), entre C1 et C3 (fin avril), entre C4 (fin mai) et C2, entre C4 et C3.

A Wegnez : En «aval», les proportions n'évoluent pratiquement pas entre novembre (C1) et fin avril (C3). Cependant, l'apparition de 1,21% d'ovocytes en stade de maturation finale (ovocyte ayant achevé la vitellogenèse exogène et dont le noyau est observable en périphérie du cytoplasme) est visible vers la fin avril (C3). Remarquons aussi les proportions particulières rencontrées vers la fin mars en «amont» de Wegnez : le stade protoplasmique n'occupe que 23,8% du tissu ovarien, 30,41% sont représentés par les ovocytes en vitellogenèse exogène, 30,1% sont représentés par le stade d'alvéoles corticaux précoces et 11% par le stade d'alvéoles corticaux avancés. Par la suite, le stade protoplasmique croît jusque 55,54% et l'apparition d'ovocytes en maturation finale est observable vers la fin mai. Le test de χ^2 n'a révélé aucune différence entre les sites pour les campagnes C3 et C4.

Globalement, le diamètre augmente entre novembre (C1) et fin mars (C2), passant de 0,68mm à 0,94mm, tous sites confondus. Ensuite, la valeur du diamètre ovocytaire diminue jusque fin mai (C4) à des valeurs proches de 0,7mm. En fin avril (C3), le diamètre moyen semble un peu plus élevé en « aval » par rapport au site « amont » alors qu'en fin mai, les différences entre les deux sites sont très faibles. L'ANOVA 2 réalisée sur les deux dernières campagnes ne montre pas d'effet du site, ni de l'interaction site – campagne. Par contre,

l'effet du facteur « campagne » a été révélé ($p < 0,0001$), la campagne de fin avril (C3) présentant un diamètre globalement plus élevé qu'en fin mai (C4).

4.2.2.2. Proportion des follicules atrétiques pré-ovulatoires (figure 4.2.2.4)

A) Les goujons femelles

A **Goffontaine** : La figure 4.2.2.4 montre que le taux d'atrésie atteint 3,92% en « amont » pour la campagne de fin mai (C4), alors que les valeurs ne dépassent pas 1% en ce qui concerne les autres sites et campagnes. Cependant, le test de χ^2 réalisé pour les campagnes C3 et C4 n'a révélé aucune différence entre l'« amont » et l'« aval » en C4 (fin mai).

A **Wegnez** : Les valeurs d'atrésie restent relativement faibles, voire nulles. La plus haute proportion rencontrée atteint seulement 1,4% (site « aval » en novembre (C1)). Le test de χ^2 réalisé pour les campagne C2 et C4 ne montre pas de différences entre les deux sites pour chacune des campagnes.

B) Les loches femelles

A **Goffontaine** : Les valeurs de l'atrésie se situent entre 0% et 2% pour la plupart des sites et des campagnes. Cependant, vers la fin avril, en « aval » de Goffontaine, le taux d'atrésie est relativement élevé, atteignant 9,6%. Le test de χ^2 réalisé pour les quatre campagnes montre d'ailleurs cette différence entre les sites « amont » et « aval » en C3 (fin avril) ($\chi^2_{\text{observé}} = 6,32$ et $\chi^2_{\text{table}} = 5,99$). L'atrésie est plus élevée en « aval ».

A **Wegnez** : Le taux d'atrésie varie entre 1,27% et 3,69%, valeur la plus élevée, rencontrée en « amont » lors de la campagne de fin mars (C2). Le test de χ^2 réalisé pour les campagne C3 et C4 ne révèle aucune différence entre les sites.

4.2.2.3. Histopathologie des testicules (tableau 4.2.2.5)

A) Les goujons mâles

Le tableau 4.2.2.5 reprend le stade le plus avancé observé pour la plupart des individus échantillonnés à différentes stations et périodes.

L'analyse histologique des testicules a été réalisée de façon qualitative. Le développement testiculaire ne semble pas montrer de différences entre les sites « amont » et « aval » pour chacune des STEP considérées. Remarquons toutefois que la spermatogenèse semble être plus tardive à Goffontaine puisque, d'une manière générale, les stades de spermatocytes (Spc) sont déjà présents à Wegnez pour la campagne de novembre (C1) alors que les mâles à Goffontaine présentent des spermatogonies B (SpgB) en tant que stade le plus avancé. De même, vers fin mars (C2), alors que les testicules des poissons capturés à Wegnez contiennent déjà des spermatides (Spd), les spermatocytes constituent le stade le plus avancé chez les mâles échantillonnés en « amont » de Goffontaine. Les spermatozoïdes étaient bien représentés dans les deux dernières campagnes de fin avril (C3) et fin mai (C4).

L'apparition d'ovotestis (figure 4.2.2.6) a été détectée chez quelques individus : Trois « intersexes » ont été observés en « amont » de Goffontaine, chacun au cours d'une campagne distincte (C2, C3, C4). Un quatrième intersexe a été observé en « amont » de Wegnez lors de la troisième campagne de prélèvement (C3).

B) Les loches mâles

Les testicules des loches mâles échantillonnés montraient tous la présence de spermatozoïdes, pour tous les sites et toutes les campagnes. Dès lors, même sur base d'une analyse qualitative, aucune différence ne peut être observée pour cette espèce. Cependant, deux « intersexes » ont été recensés en « aval » de Goffontaine et ce, pour les campagnes C3 (fin avril) et C4 (fin mai).

4.3. Paramètres biochimiques et endocriniens

4.3.1. Vitellogénine plasmatique (figure 4.3.1.1)

A) Les goujons femelles

A **Goffontaine** : Globalement, la vitellogénine (mesurée indirectement par le dosage des orthophosphates protéiques plasmatiques ou ALP) augmente entre les différentes campagnes, tous sites confondus. La valeur minimale observée est de 80,94µg/ml de plasma (C2, AMG) et la valeur maximale atteinte est de 331,56 µg/ml (C4, AVG). Vers la fin avril (C3), le site « amont » présente un taux de vitellogénine (VTG) plus élevé qu'en « aval » alors que vers la fin mai, le site « aval » montre un taux de VTG plasmatique plus élevé qu'en « amont ». L'ANOVA 2 réalisée sur les deux dernières campagnes (C3 et C4) ne révèle aucun effet significatif du site, de la campagne et de leur interaction.

A **Wegnez** : Bien que peu de données ont pu être obtenues pour cette STEP en ce qui concerne la VTG chez les goujons femelles, il est possible de constater une augmentation de la teneur plasmatique en VTG entre novembre (C1) et fin mai (C4), notamment pour le site « aval ». Les valeurs se situent entre 38,46µg/ml et 267,56µg/ml. Il n'y a pas de différence visible entre les deux sites pour la campagne C4 de fin mai. L'ANOVA 1 effectuée pour l'unique campagne C4, ne montre aucun effet du site. Un effet campagne semble toutefois évident, bien que l'ANOVA 1 n'a pu comparer les quatre campagnes entre elles.

B) Les goujons mâles

A **Goffontaine** : Il faut être prudent lorsque l'on considère les campagnes de novembre (C1) et de fin mars (C2) puisqu'elles ne sont représentées que par un seul individu. Bien que les valeurs de VTG restent fort proches entre les campagnes C3 (fin avril) et C4 (fin mai) pour le site « amont », une augmentation importante de la VTG est observée entre fin avril et fin mai pour le site « aval ». En effet, les valeurs de VTG pour ces deux campagnes varient de 58,81µg/ml à 114,25µg/ml, soit près du double. Les différences entre sites indiquent une valeur moyenne de VTG plus élevée en « aval » par rapport à l'« amont » pour les deux dernières campagnes (C3 et C4), l'écart étant plus marqué pour la campagne de fin mai (C4). Les variations individuelles étant fort élevées au sein d'un même lot de goujons, l'ANOVA 2 ne montre aucun effet significatif du site, de la campagne ou de leur interaction.

A **Wegnez** : Les valeurs de VTG augmentent progressivement dans le temps, tous sites confondus. Les valeurs en novembre (C1) ne dépassent pas 64µg/ml pour chacun des sites, alors que fin mai (C4) la VTG atteint des valeurs supérieures à 90µg/ml. Pour les campagnes de fin mars (C2) et fin avril (C3), les valeurs de VTG en « aval » sont plus élevées qu'en « amont ». Cette tendance s'inverse lors de la campagne de fin mai (C4). L'ANOVA 2

réalisée sur les trois dernières campagnes ne révèle pas d'effet du site, ni de l'interaction site - campagne, mais indique un effet significatif de la campagne ($p = 0,012$). Globalement, la Vtg en fin mars (C2) était plus faible qu'en fin mai (C4).

C) Les loches femelles

A **Goffontaine** : Les valeurs sont plus faibles en novembre et fin mars (jusque $100\mu\text{g/ml}$) tous sites confondus par rapport au taux de VTG mesuré fin mai (C4) (près de $191,49\mu\text{g/ml}$ en « aval » et $285,91\mu\text{g/ml}$ en « amont »). Pour les deux dernières campagnes, la concentration en VTG au site « amont » est plus élevée qu'en « aval ». L'ANOVA 2 réalisée sur les campagnes C2 (fin mars), C3 (fin avril) et C4 (fin mai) révèle un effet significatif du site ($p = 0,012$). Le site « amont » présente un taux de VTG plus élevé qu'en « aval ». Elle révèle également un effet campagne ($p = 0,012$), les valeurs de VTG de fin mars (C2) étant plus faibles que celles de fin mai (C4).

A **Wegnez** : Peu de données ont pu être obtenues chez les loches femelles en ce qui concerne la VTG. Il est donc difficile d'en dégager une tendance précise. Néanmoins, il semble probable que la VTG augmente entre novembre (C1) et fin mai (C4). En effet, en novembre la VTG se situe aux alentours de $20\mu\text{g/ml}$ alors que fin mai (C4), la VTG approche les $160\mu\text{g/ml}$, tous sites confondus. Vers la fin avril (C3), le site « aval » présente un taux de VTG plus faible qu'en « amont ». L'ANOVA 2 réalisée sur les campagnes C3 et C4 ne révèle aucun effet significatif du site, de la campagne et de l'interaction site – campagne.

D) Les loches mâles

A **Goffontaine** : Pour le site « amont », la VTG semble augmenter entre novembre (C1) et fin mai (C4), passant de moins de $20\mu\text{g/ml}$ à $92,27\mu\text{g/ml}$. Le graphique ne montre pas de tendance similaire pour le site « aval ». Les différences entre sites ne sont que très peu marquées. L'ANOVA 2 ne révèle aucun effet significatif du site, de la campagne, ou de leur interaction.

A **Wegnez** : Aucune tendance n'est visible. Les valeurs de VTG ne dépassent pas les $50\mu\text{g/ml}$ pour tous les sites et campagnes, excepté pour l'« amont » de Wegnez lors de la campagne de fin mars où la Vtg atteint les $200\mu\text{g/ml}$, avec un maximum de $207,17\mu\text{g/ml}$. L'ANOVA 2 réalisée sur les campagnes C3 et C4 ne montre aucun effet du site, de la campagne, ou de leur interaction.

4.3.2. Activité aromatase (figure 4.3.2.1)

A) Les goujons femelles

A **Goffontaine** : Peu de différences sont observables entre les différentes campagnes du site « aval » : les valeurs de l'activité aromatase restent inférieures ou égales à $0,2\text{ pmol/min/mg protéines}$. Pour le site « amont », l'activité aromatase semble décliner au cours des trois dernières campagnes, passant de $0,53\text{ pmol/min/mg protéines}$ en C2 (fin mars) à $0,22\text{ pmol/min/mg protéines}$ vers la fin mai (C4). Toutefois, pour ce même site, un seul individu représente la campagne de fin mai (C4). Au niveau d'éventuelles différences entre sites, la valeur obtenue en « amont » ($0,39\text{ pmol/min/mg protéines}$) pour la campagne de fin avril (C3) est plus élevée qu'en « aval » ($0,14\text{ pmol/min/mg protéines}$) pour la même date.

L'ANOVA 2 effectuée sur les campagnes C3 et C4 ne révèle aucun effet du site, de la campagne et de l'interaction site – campagne.

A Wegnez : Les données obtenues pour ce paramètre étant peu nombreuses, il est difficile d'en dégager une tendance éventuelle. Les valeurs moyennes restent toutes inférieures à 0,31pmol/min/mg protéines. Il faut émettre une réserve quand à l'utilisation de la valeur de l'activité aromatase rencontrée en « amont » pour la campagne de fin mars (C2) puisqu'un seul individu a permis d'obtenir cette donnée. En fin mai (C4), l'activité aromatase semble plus faible en « aval » (0,036pmol/min/mg protéines) par rapport au site « amont » (0,3pmol/min/mg protéines). L'ANOVA 2 réalisée sur les campagnes C2 et C4 ne montre aucun effet significatif du site, de la campagne et de leur interaction.

B) Les goujons mâles

A Goffontaine : Pour le site « amont », l'activité aromatase augmente depuis fin mars (C2) (0,09pmol/min/mg protéines) jusque fin mai (C4), campagne pour laquelle elle atteint 0,59pmol/min/mg protéines. En ce qui concerne le site « aval », les valeurs ne semblent pas évoluer au cours du temps. Elles se situent toutes en dessous des 0,21pmol/min/mg protéines. Pour les deux dernières campagnes (C3 et C4), l'activité aromatase observée pour le site « aval » est plus faible que celle observée en « amont ». L'ANOVA 2 réalisée pour les campagnes C3 (fin avril) et C4 ne révèle aucun effet significatif du site, de la campagne ou de leur interaction.

A Wegnez : Les valeurs de l'activité aromatase restent très faibles pour les quatre campagnes, ne dépassant pas 0,17pmol/min/mg protéines, et ce, quelque soit le site considéré. Au niveau de la différence possible entre les sites « amont » et « aval », l'activité aromatase est doublée en « aval » par rapport à l' « amont » vers la fin avril (C3) et fin mai (C4). Par contre, l'activité aromatase semble légèrement plus faible en « aval » qu'en « amont » lors de la campagne de fin mars (C2). L'ANOVA 2 réalisée sur les trois dernières campagnes ne montre aucun effet du site, de la campagne ou de leur interaction.

C) Les loches femelles

A Goffontaine : Pour le site « amont », une augmentation de l'activité aromatase est observable de novembre (C1) jusqu'en fin mai (C4). L'activité aromatase passe de 0,11pmol/min/mg protéines à 1,2pmol/min/mg protéines. Une évolution similaire est observée pour le site « aval ». Cependant, vers la fin avril (C3) est le double de celle rencontrée en « amont » pour cette même date. De plus, vers la fin mai, l'activité aromatase en « aval » chute à environ 0,58pmol/min/mg protéines. Il y a de fortes différences entre les deux sites pour les deux dernières campagnes (C3 et C4). L'activité aromatase était plus élevée en « aval » pour la campagne de fin avril (C3) alors que l'inverse s'observe pour la campagne de fin mai (C4). L'ANOVA 2 indique un effet très hautement significatif de l'effet « campagne » ($p = 0,0006$). Globalement, les campagnes C1 et C2 (fin mars) diffèrent des campagnes C3 et C4.

A Wegnez : Pour le site « aval » l'activité aromatase croît progressivement (de 0,07 pmol/min/mg protéines à environ 1,8 pmol/min/mg protéines) entre novembre (C1) et fin mai (C4). Les valeurs ne dépassent pas 0,5pmol/min/mg protéines pour le site « amont », quelque soit la campagne considérée. Il est évident que l'activité aromatase est beaucoup plus élevée en « aval » qu'en « amont » pour les campagnes de fin avril (C3) et fin mai (C4). L'ANOVA

2 révèle un effet « site » ($p = 0,001128$), les valeurs rencontrées en « aval » étant globalement plus élevées qu'en « amont ». Il n'y a pas d'effet de la campagne ou de l'interaction site – campagne.

D) Les loches mâles

A **Goffontaine** : Les valeurs de l'activité aromatase ne semblent pas évoluer dans le temps et restent proches ou inférieures à 0,1 pmol/min/mg protéines en ce qui concerne le site « amont ». Les valeurs obtenues en « aval » se situent pour la plupart entre 0,09 et 0,22 pmol/min/mg protéines. Pour toutes les campagnes, l'activité aromatase est plus élevée en « aval » par rapport à l'« amont ». Cependant, l'ANOVA 2 ne montre aucun effet significatif du site, de la campagne ou de leur interaction.

A **Wegnez** : Il est difficile de dégager une tendance éventuelle avec les données obtenues pour Wegnez. Les valeurs moyennes se situent entre 0,004pmol/min/mg protéines et 0,38pmol/min/mg protéines. En fin avril (C3), l'activité aromatase est plus élevée en « amont » qu'en « aval ». L'inverse se produit en fin mai (C4). L'ANOVA 2 effectuée sur les campagnes C3 et C4 ne montre aucun effet significatif du site, de la campagne ou de leur interaction.

4.3.3. Stéroïdes sexuels plasmatiques

Les différents résultats des concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels sont regroupés par espèce et par sexe, de manière à mieux comparer les variations endocriniennes d'œstradiol (figure 4.3.3.1), testostérone (figure 4.3.3.2) ,et 11-kétotestostérone (figure 4.3.3.3), ainsi que les variations de leurs rapports E2/T (figure 4.3.3.4) et 11KT/T (figure 4.3.3.5).

A) Les goujons femelles

A **Goffontaine** : Globalement, les valeurs de 17 β -œstradiol (E2) sont comprises entre 4,07ng/ml et 5,49ng/ml. Aucune tendance générale ne peut être dégagée. Les valeurs d'E2 pour la campagne de fin avril (C3) sont légèrement plus élevées en « aval » alors que l'inverse se produit lors de la campagne de fin mai (C4). Cependant l'ANOVA 2 réalisée pour les campagnes C3 et C4 ne montre aucun effet significatif du site, de la campagne, ou de leur interaction. Il faut néanmoins rester prudent lors de l'analyse des résultats « stéroïdes ». En effet, la variabilité inter-individuelle ne doit pas être négligée dans l'interprétation de tels résultats étant donné la pulsativité de la libération des stéroïdes dans le plasma sanguin.

Les valeurs de testostérone (T) se situent entre 1,55ng/ml et 6,07ng/ml. Pour la plupart des campagnes, la concentration plasmatique ne dépasse pas 3ng/ml, excepté pour l'« amont » lors de la campagne de fin mai (C4) pour lequel le taux de T atteint 6,07ng/ml de plasma. Une nette différence est observable vers la fin mai entre le site « amont » et « aval », ce dernier montrant un taux plasmatique trois fois plus faible. L'ANOVA 2 réalisée sur les deux dernières campagnes ne montre toutefois aucun effet du site, de la campagne ou de l'interaction site - campagne.

Le rapport E2/T varie entre 1,37 et 2,77. Il diminue progressivement entre novembre (C1) et la fin mai (C4). Toutefois, il est plus élevé en « aval » par rapport au site « amont » pour les campagnes C3 (fin avril) et C4 (fin mai). L'ANOVA 2 réalisée sur les campagnes C3 et C4 ne révèle aucun effet significatif du site, de la campagne et de leur interaction.

Les concentrations en 11-kétotestostérone (11-KT) sont comprises entre 0,22ng/ml et 1,3ng/ml. Les valeurs sont relativement faibles en comparaison de celles rencontrées chez les mâles pour la même station, concentrations pouvant atteindre les 15-16ng/ml. L'ANOVA 2 effectuée pour les campagnes C3 et C4 ne montre aucun effet du site, de la campagne et de l'interaction entre ces deux facteurs.

Les valeurs du rapport 11KT/T sont comprises entre 0,096 et 0,54. Aucune tendance particulière n'est observable entre les divers sites et campagnes. Comme pour le rapport E2/T, l'ANOVA 2 ne révèle aucun effet significatif du site, de la campagne ou de l'interaction site – campagne.

A Wegnez : Les valeurs d'E2 sont comprises entre 3,66 et 7,38ng/ml. Pour la campagne de fin mai (C4), la concentration plasmatique en E2 est légèrement plus faible pour le site « aval ». L'ANOVA 1 effectuée sur la campagne C4 ne montre toutefois aucun effet du site.

Les valeurs de T sont comprises entre 1,88ng/ml et 4,4ng/ml, tous sites et campagnes confondus. Notons que les données obtenues pour les campagnes de fin mars (C2) et fin avril (C3) ne sont représentées que par un seul individu. La concentration en testostérone est plus élevée (4,4ng/ml) en « aval » qu'en « amont » (1,88ng/ml) pour la campagne de fin mai (C4). L'ANOVA 1 effectuée sur cette campagne révèle un effet significatif du site ($p = 0,015$), les individus du site « aval » présentant bien une concentration de testostérone plus élevée.

Le rapport E2/T évolue entre 1,21 et 3,16. Vers la fin mai (C4), le site « aval » présente un rapport E2/T plus faible qu'en « amont ». L'ANOVA 1 réalisée pour la campagne C4 révèle un effet significatif du site ($p = 0,043$), ce qui confirme la présence du rapport E2/T plus élevé en « amont » pour cette campagne.

Les concentrations en 11-KT sont comprises entre 0,33ng/ml et 3,17ng/ml. Remarquons que vers la fin mai (C4), le site « aval » présente un taux de 11-kétotestostérone plus faible qu'en « amont ». L'ANOVA 1 réalisée sur la campagne C4 révèle bien un effet significatif du site ($p = 0,0018$).

Les valeurs 11KT/T calculées varient entre 0,17 et 1,35. Une différence est rencontrée entre les deux sites lors de la campagne de fin mai (C4). L'ANOVA 1 réalisée pour la campagne C4 montre un effet significatif du site, l'« aval » présentant un rapport plus faible que l'« amont » ($p = 0,015$).

B) Les goujons mâles

A Goffontaine : Les valeurs d'E2 varient peu au cours du temps et sont comprises entre 3,55ng/ml et 5,2ng/ml. On constate que les valeurs sont aussi importantes que chez les femelles pour l'ensemble des sites et des campagnes à Goffontaine. Un écart d'un peu plus d'1ng/ml différencie les deux sites pour la campagne de fin mai (C4), le site « aval » présentant la concentration la plus élevée. L'ANOVA 2 réalisée sur les campagnes C3 (fin avril) et C4 révèle un effet significatif du site ($p = 0,015$). Les individus échantillonnés en fin mai au site « aval » présentent bien un taux d'E2 plus élevé que ceux du site « amont ».

Les concentrations en T rencontrées, toutes campagnes confondues varient entre 2,05ng/ml et 2,8ng/ml. Les valeurs sont du même ordre de grandeur que les concentrations rencontrées chez les femelles à Goffontaine, quelque soient les sites et les dates. Pour le site « amont », il est possible de distinguer une légère augmentation depuis la fin mars (C2) jusqu'à la fin mai (C4). En ce qui concerne la comparaison entre sites, les valeurs obtenues pour chacune des deux dernières campagnes (C3 et C4) sont relativement proches. L'ANOVA 2 réalisée sur les campagnes C3 et C4 ne révèle aucun effet du site, de la campagne ou de leur interaction.

Les valeurs E2/T calculées sont comprises entre 1,28 et 2,32. Lors de la campagne de fin mai (C4), le rapport E2/T est plus élevé en « aval ». L'ANOVA 2 réalisée pour les deux dernières campagnes révèle un effet de l'interaction site – campagne ($p = 0,034$), confirmant la différence entre les deux sites lors de la campagne de fin mai (C4).

Les valeurs en 11-KT sont plus élevées que chez les femelles de la même station, évoluant entre 1,32ng/ml et 16,78ng/ml. Une augmentation de la 11-kétotestostérone au cours des trois dernières campagnes est observable pour le site « amont ». En fin avril (C3) et fin mai (C4), les individus capturés en « aval » présentent une concentration plasmatique en 11-kétotestostérone plus élevée qu'en « amont ». L'ANOVA 2 réalisée pour les campagnes C3 et C4 montre un effet significatif du site ($p < 0,001$), l'« aval » présentant un taux de 11-kétotestostérone plus élevé. Aucun effet campagne ou interaction site - campagne n'a pu être révélé.

Les rapports 11-K/T se situent entre 0,71 et 7,07. Globalement, tous sites confondus, on constate une augmentation du rapport entre C2 (fin mars) et C4 (fin mai). Pour les campagnes C3 et C4, le site « aval » présente un rapport 11KT/T plus élevé. L'ANOVA 2 réalisée sur les deux dernières campagnes révèle un effet significatif du site ($p < 0,001$) et de la campagne ($p = 0,049$). Tous sites confondus la campagne C4 (fin mai) présente un rapport 11KT/T plus important. Pour les deux campagnes, le site « aval » présente une valeur 11KT/T plus élevée.

A Wegnez : Les valeurs d'E2 sont comprises entre 3,54ng/ml et 5,09ng/ml soit des concentrations aussi élevées que chez les femelles. Globalement, il n'y a pas de différence entre les sites « amont » et « aval », excepté pour la campagne de fin mai pour laquelle la concentration en E2 est plus faible en « aval » (3,54ng/ml contre 5,09ng/ml en « amont »). L'ANOVA 2 réalisée sur les trois dernières campagnes (C2, C3, C4) ne montre aucun effet du site ou de la campagne. Cependant, elle révèle une interaction entre les deux facteurs ($p = 0,012$). Le test Post-Hoc montre que la concentration en E2 à la station « amont » de la campagne C4 est significativement plus élevée que celle rencontrée en « aval » pour la même campagne, et celle observée en « amont » vers la fin mars (C2).

Les concentrations plasmatiques en T varient de 1,8ng/ml à 2,9ng/ml. En « aval », le taux de testostérone augmente depuis novembre (C1) jusqu'à fin mai (C4). Dans l'ensemble, les concentrations observées sont semblables à celles rencontrées chez les femelles pour la même station. L'ANOVA 2 effectuée pour les campagnes C2, C3 et C4 ne montre aucun effet du site, de la campagne, ou de leur interaction éventuelle.

Les valeurs E2/T sont comprises entre 1,28 et 2,56. Une diminution du rapport est observable pour le site « aval », alors qu'aucune tendance n'est visible en « amont ». Il semble que vers la fin mai (C4) le site « amont » présente un rapport E2/T plus élevé qu'en « aval ». L'ANOVA 2 effectuée sur les campagnes C2 (fin mars), C3 (fin avril) et C4 (fin mai), montre un effet de l'interaction site – campagne ($p < 0,001$), le site « amont » échantillonné en fin mai présentant un rapport moyen plus élevé que la plupart des autres sites, excepté pour le site « aval » de la campagne C2 (fin mars) avec lequel aucune différence n'est révélée.

Globalement, les valeurs de 11-kétotestostérone varient entre 0,58ng/ml et 16,7ng/ml. Notons que la variabilité inter-individuelle est relativement importante. Une augmentation de la concentration en 11-kétotestostérone est observée entre novembre (C1) et fin mai (C4) pour les sites « aval ». Vers la fin avril (C3) et la fin mai (C4), il est possible d'observer des différences entre site. Toutefois, en C3, le taux de 11-kétotestostérone est plus faible en « aval » alors qu'en C4, le site « aval » présente une concentration plus élevée. L'ANOVA 2 réalisée pour C2, C3 et C4 montre un effet significatif de la campagne d'échantillonnage : la

campagne de fin mars (C2) diffère de la campagne de fin avril (C3) mais également de celle de fin mai (C4) pour lesquelles les concentrations rencontrées sont plus élevées.

Les rapports 11KT/T sont compris entre 0,34 et 6,30. Globalement, le rapport augmente entre novembre (C1) et fin mai (C4), tous sites confondus. L'ANOVA 2 effectuée pour les campagnes C2, C3 et C4 révèle un impact significatif de la campagne ($p = 0,0086$), les campagnes C2 et C4 étant différentes l'une de l'autre.

C) Les loches femelles

A Goffontaine : Les valeurs d'E2 varient entre 3,86ng/ml et 6,32ng/ml. Excepté pour la campagne de novembre (C1), le taux d'E2 observé en « aval » est plus faible que celui rencontré en « amont ». L'ANOVA 2 réalisée pour les quatre campagnes ne montre aucun effet du site, de la campagne ou de leur interaction.

Les concentrations plasmatiques en T se situent entre 1,68ng/ml et 4,44ng/ml. Les valeurs entre sites sont fort semblables au sein d'une même campagne. L'ANOVA 2 réalisée pour l'ensemble des campagnes ne montre aucun impact du site, de la campagne et de l'interaction simultanée du site et de la campagne.

Les rapports E2/T sont compris entre 1,21 et 3,55. Une diminution est observable entre novembre (C1) et fin mai (C4), bien que cette tendance se précise particulièrement pour le site « amont ». En novembre (C1), le site « aval » présente un rapport E2/T plus important qu'en « aval ». Pour les campagnes C3 (fin avril) et C4 (fin mai), les valeurs obtenues pour les deux sites sont similaires. La prudence est de mise lors de la prise en considération des résultats de la campagne C2 (fin mars), le site « aval » n'étant représenté que par un seul individu. L'ANOVA 2 réalisée pour l'entièreté des campagnes indique un effet significatif de la campagne ($p = 0,0065$) : la campagne C1 (novembre) présente un rapport E2/T plus élevé que les trois autres campagnes, tous sites confondus.

Les concentrations en 11-kétotestostérone varient de 0,27ng/ml à 1,49ng/ml. Notons que les variabilités inter-individuelles sont importantes entre les différents sites et campagnes. Excepté pour la campagne de avril (C3), le site « amont » présente une concentration en 11-kétotestostérone plus faible que celui en « aval ». L'ANOVA 2 révèle d'ailleurs un effet significatif du site ($p = 0,032$), la concentration étant globalement plus élevée en « amont ».

Les rapports 11KT/T rencontrés à Goffontaine varient entre 0,10 et 0,89. La variabilité inter-individuelle est relativement importante au vu des grands écartypes observés sur le graphique. L'ANOVA 2 réalisée pour toutes les campagnes n'indique aucun impact significatif du site, de la campagne et de leur interaction.

A Wegnez : Globalement, les valeurs d'E2 sont comprises entre 3,46ng/ml et 8,24ng/ml, valeur la plus importante obtenue en « amont » lors de la campagne de fin mai (C4). Les valeurs sont fort proches de 4ng/ml excepté pour le site « amont » en fin mai pour lequel le taux d'E2 atteint 8,24ng/ml. Une forte différence (8,24ng/ml et 4,6ng/ml) entre la concentration plasmatique d'E2 pour les deux sites « amont » et « aval » est observable vers la fin mai (C4). L'ANOVA 2 montre un effet significatif de la campagne ($p = 0,011494$) et de l'interaction site – campagne ($p = 0,0129$). Globalement, la campagne de fin avril présente un taux d'E2 plus faible qu'en fin mai. L'effet de l'interaction révèle que le site « amont » en fin mai (C4) diffère du site « aval » échantillonné lors de la même campagne, et de la campagne de fin avril, quel que soit le site considéré.

Les valeurs de T sont comprises entre 1,35ng/ml et 6,97ng/ml. La concentration obtenue en « amont » est deux fois plus élevée que celle rencontrée en « aval » pour les campagnes C3 et C4. D'ailleurs, L'ANOVA 2 réalisée pour ces deux campagnes révèle un

effet significatif du site ($p = 0,022$), le site « amont » présentant un taux de testostérone plus élevé qu'en « aval ».

Les valeurs E2/T se situent entre 0,71 et 2,46. Globalement, les valeurs obtenues pour la campagne C3 (fin avril) sont plus faibles que celles rencontrées en fin mai (C4). En C3, le site « aval » présente un rapport E2/T plus élevé qu'en « amont ». L'ANOVA 2 effectuée sur les deux dernières campagnes révèle un impact significatif du facteur « campagne » ($p = 0,01$), le rapport E2/T étant plus faible en fin avril (C3).

Le taux de 11-kétotestostérone plasmatique varie de 0,16ng/ml à 2,31ng/ml. Aucune tendance particulière n'est observable au cours du temps. Cependant, la concentration en μ 11-kétotestostérone en « aval » pour la campagne de fin mai (C4) est plus importante qu'en « amont ». L'ANOVA 2 réalisée pour les campagnes C3 et C4 indique un effet significatif du site ($p = 0,0025$), de la campagne ($p < 0,001$) mais aussi de l'interaction site – campagne ($p = 0,008$). Globalement, la concentration en 11-kétotestostérone est plus faible en « aval » pour les deux campagnes. De plus, le taux plasmatique de 11-kétotestostérone augmente entre fin avril (C3) et fin mai (C4). Le test Post-Hoc HSD de Tukey révélant les différences entre les sites et stations indique que la station « amont » de la campagne C4 diffère significativement du site « aval » pour la même période, mais aussi des deux sites échantillonnés en campagne C3 (fin avril).

Les valeurs relatives au rapport 11KT/T sont comprises entre 0,078 et 0,71. Globalement la campagne C3 (fin avril) présente des rapports 11KT/T plus faibles qu'en C4 (fin mai). L'ANOVA 2 réalisée pour les campagnes de fin avril (C3) et fin mai (C4) révèle d'ailleurs un effet significatif de la campagne ($p < 0,001$).

D) Les loches mâles

A Goffontaine : Les concentrations en E2 sont comprises entre 3,19ng/ml et 5,46ng/ml, soit des valeurs similaires à celles rencontrées chez les femelles. L'ANOVA 2 réalisée pour les quatre campagnes ne révèle aucun effet significatif du site, de la campagne ou de leur interaction.

Les valeurs de testostérone se situent dans un intervalle allant de 1,57ng/ml à 2,79ng/ml. Une légère tendance à l'augmentation est observable en « amont » depuis novembre (C1) jusqu'en fin mai (C4). Excepté pour la campagne de fin mars (C2), le taux de testostérone est plus faible en « aval » par rapport à l'« amont » pour les trois campagnes restantes. Remarquons toutefois la forte variabilité inter-individuelle existante aux différents sites. L'ANOVA 2 effectuée sur toutes les campagnes n'indique aucun effet significatif ni du site, de la campagne et de leur interaction.

Les valeurs E2/T obtenues se situent entre 1,26 et 2,23. Excepté pour la campagne C2 (fin mars), le site « aval » présente un rapport E2/T moyenne plus élevé. Cependant, il ne faut pas omettre la présence d'un seul individu utilisé en « amont » pour les campagnes de fin mars (C2 et fin avril (C3)). L'ANOVA 2 réalisée sur toutes les campagnes ne révèle aucun effet significatif du site, de la campagne ou de leur interaction.

Les valeurs en 11-KT sont comprises entre 0,76ng/ml et 6,77ng/ml. Aucune tendance particulière n'est observable dans l'ensemble des sites échantillonnés. L'ANOVA 2 réalisée pour les quatre campagnes ne révèle aucun effet du site, de la campagne ou de leur interaction.

Les valeurs 11KT/T varient entre 0,45 et 2,24. Aucune tendance claire ne peut être dégagée des données observées, les valeurs étant relativement proches dans l'ensemble. L'ANOVA 2 réalisée pour toutes les campagnes ne montre aucun effet significatif du site, de la campagne ou de leur interaction.

A **Wegnez** : Globalement, une tendance à l'augmentation de la concentration en E2 au cours du temps peut être observée entre les quatre campagnes. Il faut toutefois rester prudent puisque trois valeurs ont été obtenues sur base d'un seul individu. La concentration en E2 est légèrement plus faible en « aval » par rapport à l'« amont » lors de la campagne de fin mai (C4). L'ANOVA 2 effectuée pour les deux dernières campagnes montre un effet campagne ($p = 0,031589$). Globalement le taux d'E2 est plus faible fin avril (C3) que fin mai (C4).

Les concentrations plasmatiques en testostérone varient de 1,31ng/ml à 2,43ng/ml. Globalement, on constate une augmentation du taux de testostérone entre novembre (C1) et la fin mai (C4). En terme de comparaison entre les deux sites, aucune tendance particulière n'est visible à Wegnez. L'ANOVA 2 réalisée sur les campagnes C3 et C4 ne montre aucun effet significatif du site et de la campagne. Aucune interaction entre les deux facteurs n'influence de manière significative les concentrations entre les sites.

Les rapports E2/T varient entre 1,49 et 2,8. Notons que trois sites ne sont représentés que par un seul individu. La campagne de fin mai (C4) montre une différence entre sites, l'« amont » présentant un rapport E2/T plus important. L'ANOVA 2 réalisée sur C3 et C4 révèle une influence significative de la campagne ($p = 0,03$), le rapport E2/T augmentant entre fin avril (C3) et fin mai (C4).

Les concentrations en 11-KT sont comprises entre 0,49ng/ml et 10,3ng/ml. Il faut prendre en compte, dans l'analyse et l'interprétation des résultats, le fait que trois de ces valeurs ont été obtenues sur base d'un seul individu. Une forte différence est visible entre les deux sites « amont » et « aval » pour la campagne de fin mai (C4), le site « amont » présentant une moyenne plus élevée. L'ANOVA 2 effectuée sur les campagnes C3 et C4 ne montre aucun effet du site, de la campagne et de leur interaction.

Les rapports 11KT/T se situent entre 0,38 et 5,17. Excepté pour le site « amont » en C4 (fin mai), les valeurs rencontrées sont relativement proches. L'ANOVA 2 réalisée sur les deux dernières campagnes n'indique aucun effet du site, de la campagne ou de leur interaction.

4.3.4. Activité EROD

Pour rappel, compte tenu de la petite taille des espèces capturées, il ne nous a pas été possible de doser les activités EROD sur le foie de chaque individu, et les dosages ont dès lors été effectués sur des lots de poissons de la même espèce et du même sexe par campagne et site d'échantillonnage (figure 4.3.4.1). De ce fait, aucune analyse statistique n'a été réalisée.

A) Les goujons femelles

A **Goffontaine** : Les valeurs sont comprises entre 10,29 et 0,18pmol/min/mg protéines. Pour le site « aval », une diminution de l'activité EROD au cours du temps est observable. Globalement, les valeurs les plus faibles pour les deux sites sont rencontrées en fin mai (C4). Excepté pour le site « AVG » en novembre (C1), l'activité EROD chez les femelles est relativement faible et toujours plus basse que chez les mâles de la même station.

A **Wegnez** : L'activité EROD varie de 0 à 10,12pmol/min/mg protéines. Une différence est visible entre l'« amont » et l'« aval » de Wegnez pour la campagne C2 (fin mars), l'activité EROD passant de 1,14 à 10,12pmol/min/mg protéines. Mis à part cette valeur relativement élevée, l'activité EROD reste faible chez les femelles en comparaison avec les mâles de la même station pour lesquels l'activité se situe au delà de 5pmol/min/mg protéines pour tous les sites.

B) Les goujons mâles

A **Goffontaine** : L'activité EROD est plus globalement plus élevée que chez les femelles, atteignant des valeurs comprises entre 9 et 15,25pmol/min/mg protéines. Aucune tendance ne peut être dégagée de telles données.

A **Wegnez** : les valeurs de l'activité EROD sont comprises entre 6,36 et 19,09pmol/min/mg protéines, soit plus élevées que chez les femelles dans l'ensemble. L'activité EROD semble augmenter au cours du temps, tous sites confondus. De plus, le site « aval » présente une activité environ deux fois plus élevée qu'en « amont » lors des campagnes de fin mars (C2) et fin avril (C3).

C) Les loches femelles

A **Goffontaine** : Globalement l'activité EROD varie entre 2,28 et 22,06. Dans l'ensemble, l'activité EROD paraît diminuer entre C1 (novembre) et C4 (fin mai). La plupart des valeurs se situent en dessous de 10pmol/min/mg protéines excepté pour le site « aval » en C1 qui présente une activité bien plus élevée. Pour l'ensemble des campagnes, l'activité EROD est près de deux fois plus élevée en « aval » en comparaison avec le site « amont ».

A **Wegnez** : les valeurs sont comprises entre 1,31 et 24,04pmol/min/mg protéines. Excepté pour les sites « aval » en C1 (novembre) l'activité EROD ne dépasse pas les 7pmol/min/mg protéines. Les valeurs semblent diminuer au cours du temps, tous sites confondus ; En fin mai (C4), bien que l'activité EROD soit globalement faible, l'activité rencontrée en « aval » est deux fois plus élevée qu'en « amont » (1,31pmol/min/mg protéines contre 3,37pmol/min/mg protéines).

D) Les loches mâles

A **Goffontaine** : Les valeurs sont comprises entre 11,94 et 45,85pmol/min/mg protéines, soit des valeurs plus élevées que la plupart des femelles. Globalement, aucune différence n'est observable pour l'ensemble des sites. Remarquons que l'activité EROD du site « aval » pour la campagne de novembre est relativement élevée (45,85pmol/min/mg protéines).

A **Wegnez** : L'activité EROD varie entre 13,54 et 74,6pmol/min/mg protéines. Globalement, l'activité EROD augmente au cours du temps. Pour les campagnes C3 et C4 il est probable qu'une différence existe entre les deux sites, le site « aval » présentant une activité EROD plus de deux fois supérieure à celle mesurée en « amont ». Les valeurs sont plus élevées que celles rencontrées chez les femelles de la même station.

5.1. Paramètres morphologiques et histologiques

Dans la partie qui va suivre, nous allons discuter des résultats morphologiques et histologiques obtenus et décrits précédemment, les confrontant à d'autres données dans la littérature et en discutant de l'influence éventuelle de la méthodologie utilisée. Une seconde partie traitera de la même manière, quant à elle, les résultats des paramètres biochimiques. Une troisième partie concernera l'analyse de l'éventuelle influence de facteurs liés à un aspect plus méthodologique.

5.1.1. Rapport gonado-somatique

Concernant le rapport gonado-somatique, et contrairement à toute attente, aucune différence significative n'a été observée dans le temps, excepté pour les goujons mâles à Wegnez. Il faut cependant garder à l'esprit que les analyses statistiques effectuées pour chaque espèce et chaque sexe n'ont pu tenir compte des campagnes incomplètes pour lesquelles aucun individu n'avait été capturé à l'un ou l'autre site (« amont » ; « aval »). Ceci est également valable pour tous les autres paramètres. Dès lors, la prudence est de rigueur dans l'interprétation temporelle des données. Malgré tout, les valeurs de RGS rencontrées chez les goujons femelles (entre 5,56 et 16,6%, voire jusqu'à 24,27% en « amont » de Wegnez) au cours de cette étude se situent dans un même intervalle que celles obtenues par Rinchard et al. (1993), ceux-ci ayant observé des RGS compris entre 3,10% en octobre et 16,53% en juin. Les RGS des goujons mâles calculés pour cette étude (entre 0,94 et 2,24%) correspondent à ceux obtenus par Kestemont (1989), valeurs se situant entre 0,9 et 2,4%. Les différences importantes observables entre sexes sont dues à une différence d'allocation énergétique apportée aux testicules ou aux ovaires, aux dépens d'autres organes et processus vitaux. Notons que la variabilité est relativement forte entre les différents échantillons.

Excepté pour les loches femelles à Goffontaine, aucune différence de RGS n'est observable entre sites, et ce pour les deux espèces et les deux sexes. Carballo et al. (2005) confirment cette observation. Ayant étudié une STEP en Espagne, ils n'ont pas observé de différences de RGS chez la carpe commune *Cyprinus carpio*, selon le site. Ils concluent que les composés oestrogéniques libérés par la STEP ne sont pas assez concentrés pour affecter la croissance gonadale. Une dilution importante de l'effluent au sein d'une rivière de volume et débit suffisants expliquerait cette absence d'effet. Ils mentionnent cependant que des diminutions de RGS ont tout de même pu être rencontrées face à ce type de pollution. C'est d'ailleurs le cas pour les loches femelles capturées à Goffontaine. On constate que le RGS moyen est plus faible en « aval », toutes campagnes confondues. Cette constatation va de paire avec un diamètre moyen du stade le plus avancé plus faible en « aval » ainsi qu'une faible quantité de VTG plasmatique pour ce même site. Une étude menée en Chine sur une grande STEP confirme encore cette diminution de RGS des medakas japonais en « aval », l'effluent étant capable d'induire la diminution de la croissance gonadale, mais ce, chez les deux sexes, les mâles étant globalement plus sensibles à ce type de perturbation (Ma *et al.*, 2005).

Il est important de constater que le RGS varie fortement entre les individus de certains sites (loches femelles aux deux stations et loches mâles à Goffontaine). En ce qui concerne les mâles, les manipulations lors des campagnes de pêches ont pu provoquer le réflexe de spermiation. Ceci peut alors induire une variabilité supplémentaire entre les individus capturés, masquant d'éventuelles différences. De même, les individus femelles ne présentaient pas toujours le même stade de maturation lors de leur capture, une grande variabilité peut dès lors provenir de la différence de RGS entre les femelles ayant pondu récemment et celles

n'ayant pas encore pondu. Par ailleurs, les phénomènes d'atrésie pré-ovulatoire n'induisent pas une diminution rapide de RGS, limitant de ce fait la pertinence de cet indice s'il est utilisé comme seul descripteur de la maturité sexuelle des poissons.

Malgré ces quelques désavantages, l'intérêt du RGS réside dans le fait qu'il s'agit d'un paramètre hautement intégratif étant donné qu'il n'est pas nécessairement spécifique à un mécanisme particulier. Dès lors, il peut refléter des troubles présents à des niveaux d'organisation biologique plus faibles, par exemple des altérations des niveaux de stéroïdes circulants (Ankley *et al.*, 1998).

5.1.2. Paramètres histologiques

L'évolution temporelle des proportions des différents stades ovocytaires chez les goujons femelles tend globalement vers une augmentation de la proportion d'ovocytes en vitellogenèse exogène pour les deux stations. A Goffontaine, le diamètre moyen du stade ovocytaire le plus avancé est supérieur fin avril par rapport à fin mai. Ceci sous-tend l'hypothèse d'une ponte récente. En ce qui concerne les différents stades rencontrés au cours du temps, les données observées rejoignent celles obtenues par Kestemont (1987) qui mentionne, chez le goujon, la présence d'ovocytes protoplasmiques et en vitellogenèse endogène (alvéoles corticaux précoces et avancés) durant toute l'année. Ensuite, le réchauffement de l'eau qui se produit en mai induit l'apparition du stade de vitellogenèse exogène, parallèlement à une augmentation de la taille moyenne des ovocytes les plus avancés, jusque 1,1mm. La taille maximale du diamètre obtenue chez les goujons femelles est de 1,19mm, ce qui rejoint la valeur mentionnée précédemment. D'après Kestemont (1987, 1990) et Rinchar et al. (1993), il est important de garder en mémoire le caractère continu de l'ovogenèse. En effet, si la croissance des ovocytes au sein d'un stade donné (X) augmente le diamètre moyen du stade considéré, la croissance des plus gros ovocytes de ce stade (X) vers le stade suivant (Y), de même que l'entrée de petits ovocytes d'un stade antérieur (W) vers ce stade considéré (X) diminue le diamètre moyen de ce même stade (X). Ainsi la diminution du diamètre moyen observé en fin mai chez les goujons femelles résulte de la ponte des ovocytes les plus avancés et de grande taille.

Les proportions ovocytaires chez les loches femelles évoluent aussi dans le temps vers une augmentation du stade de vitellogenèse exogène aux dépens des ovocytes protoplasmiques, suivie de l'apparition d'ovocytes en maturation finale et de follicules post-ovulatoires (fin avril), également signes d'une ponte récente. Pour les deux stations, le diamètre moyen du stade le plus avancé est plus élevé en fin avril par rapport à la campagne de fin mai, ce qui confirme, tout comme pour les goujons à Goffontaine, l'existence d'un ponte récente.

En ce qui concerne la différence entre sites, les goujons femelles capturés à Goffontaine présentent une différence dans l'état de maturité entre le site « amont » et « aval ». Les individus analysés au site « amont » possèdent un plus grand nombre d'ovocytes protoplasmiques alors que le site « aval » montre une quantité plus importante de stades avancés (ovocytes au stade d'alvéoles corticaux précoces, avancés et stade de vitellogenèse exogène). Ceci témoigne donc d'un état de maturation plus avancé en aval. Pourtant, une étude menée par Noaksson et ses collaborateurs (2004 ; *in press*) indique que le pourcentage de femelles de perche commune sexuellement matures est plus faible en « aval » des STEP. Quoi qu'il en soit, une altération dans le timing de la maturité sexuelle peut avoir des effets néfastes pour les populations à reproduction saisonnière, les gamètes pouvant être produits à une période non optimale pour la survie de la progéniture (Brion *et al.*, 2004). Une différence entre sites est également observable pour le diamètre ovocytaire chez les loches femelles de

Goffontaine, le diamètre moyen est plus élevé en amont qu'en aval. Cela signifie qu'en aval, l'incorporation de vitellogénine (VTG) doit être plus faible puisqu'elle est responsable de l'augmentation de taille des ovocytes. Cette lipoprotéine étant produite sous l'influence de l'oestradiol (E2), cela signifierait que ce stéroïde serait produit en plus petite quantité. La Vtg est d'ailleurs plus faible en aval de Goffontaine pour les loches femelles, de même que le RGS. Cependant aucune différence n'est observable pour l'E2.

Pour les autres sites, et sexes, aucune différence n'a pu être constatée en regard des proportions des ovocytes présents dans l'ovaire et des diamètres du stade le plus avancé. Plusieurs hypothèses pour l'interprétation de tels résultats peuvent être proposées. Selon la première hypothèse, ces observations sont semblables aux résultats de Jobling et Tyler (2003) qui n'ont pu démontrer l'induction d'un développement altéré des cellules sexuelles chez différentes espèces de poissons exposés aux effluents. Les conclusions de leur expérience indiquent que l'absence d'altération du développement gonadal est probablement due à une trop faible contenance d'agents causatifs dans l'effluent, au manque de sensibilité du stade de vie exposé et de l'espèce étudiée, ou encore à une trop faible durée de l'exposition. Rappelons que dans notre étude, les poissons considérés (loche et goujon) ont une durée de vie moyenne relativement courte (4 ans), avec une mortalité généralement élevée après le 3^{ème} été. Bien que nous n'ayons pas déterminé l'âge des poissons capturés, il est fort probable que la proportion de poissons de plus de 3 ans soit très faible. Ceci constitue évidemment un élément non négligeable à prendre en considération lors de l'utilisation d'espèces sentinelles telles que la loche ou le goujon, alors que d'autres espèces, telles que le chevaine par exemple, ont une durée de vie, et donc d'exposition aux polluants, beaucoup plus longue (Flammarion et al., 2002). La seconde hypothèse implique le fait que les femelles capturées sur même site pouvaient présenter des différences dans leur stade de maturité, ce qui se reflète notamment par des variations « naturelles » de RGS, de concentration en vitellogénine et de stéroïdes sexuels plasmatiques. Ainsi des différences subtiles n'auraient pu être mises en évidence suite à la variabilité inter-individuelle élevée qui en résulte. Peut être aurait-il été intéressant de reclasser les données selon le stade de maturité des poissons, et non uniquement selon la date d'échantillonnage, puis d'analyser communément les données appartenant à des femelles présentant le même stade de maturité.

L'interprétation des données d'atrésie indique que les proportions rencontrées sont relativement faibles (moins de 2%, excepté pour quelques sites). Jobling et Tyler (2003) indiquent d'ailleurs que les effets néfastes d'un effluent de STEP sont moins évidents à observer chez les poissons femelles appartenant à différentes espèces. Toutefois, les loches femelles capturées à Goffontaine présentent un taux d'atrésie plus élevé en aval, atteignant jusqu'à 10%. Jobling et al. (2002) confirment cette observation, une plus grande proportion de follicules atrétiques préovulatoires étant détectée chez le gardon femelle *Rutilus rutilus* en aval d'une STEP. Il rappelle aussi que l'atrésie est un phénomène peu commun chez les femelles saines.

Pour les goujons mâles, les données qualitatives rapportant le stade le plus avancé présent au cours du temps sont confirmées par Kestemont (1989). Il affirme l'existence de deux périodes distinctes dans le cycle spermatogénique. La première s'étend d'octobre à mars et se caractérise par la présence de spermatogonies A et B (Spg A et B). La deuxième période commence en avril et dure jusqu'en août. Au cours de cette période, les 5 stades cellulaires sont présents : les spermatogonies A et B restent présentes toute l'année, les spermatocytes (Spc) apparaissent en mars tandis que les spermatides (Spd) et spermatozoïdes (Spz) apparaissent en avril. Ces trois derniers stades sont seulement observables à l'approche de la période de reproduction. Aucune différence entre les sites « amont » et « aval » n'a été

détectée pour les goujons, et ce pour chacune des stations. Toutefois, les individus de Goffontaine présentent une spermatogenèse plus tardive. La position des sites de Goffontaine, situés plus en « aval » sur le cours d'eau peut être une explication, sachant que cette région de la Vesdre reçoit la pollution de la ville de Verviers et aussi probablement une éventuelle pollution provenant de la station de Wegnez. Toutefois, ceci reste hypothétique.

Des ovotestis ont été observés pour différents sites : amont de Goffontaine, amont de Wegnez et aval de Goffontaine. D'après Jobling et Tyler (2003), les effets des effluents de STEP sur la différenciation et le développement testiculaire se traduisent souvent par la présence d'intersexualité, situation anormale chez des espèces telles que la brème commune *Abramis brama*, le gardon, la perche et le goujon. Les intersexes présentent généralement un taux de vitellogénine (VTG) et de stéroïdes sexuels plasmatiques altérés. En effet, la concentration en oestradiol (E2) est intermédiaire entre celle rapportée chez les mâles et celle présente chez les femelles. La testostérone (T) est, quant à elle, 2 à 3 fois plus élevée chez les intersexes que chez les mâles. Pourtant lors de notre étude aucune différence particulière n'a pu être constatée pour ces paramètres chez les intersexes. La progression de la spermatogenèse peut aussi être retardée pour une grande proportion des intersexes et des mâles exposés (Jobling *et al.*, 2002). Globalement, mais sans certitude statistique, le retard dans la progression de la spermatogenèse rencontrée à Goffontaine peut être en relation avec la plus grande proportion d'intersexes observés à cette station. Notons cependant que l'âge des poissons utilisés peut influencer la variabilité de la féminisation, les intersexes sévères étant généralement des individus plus vieux, exposés à la pollution depuis longtemps. Ainsi l'importance de l'incidence et de la sévérité des intersexes peut être due à des distributions d'âge différentes (Jobling et Tyler, 2003).

5.2. Paramètres biochimiques et endocriniens

5.2.1. La vitellogénine plasmatique

Les concentrations en VTG chez les loches femelles capturées à Goffontaine sont plus faibles en fin mars par rapport à celles obtenues en fin mai. L'évolution parallèle du diamètre ovocytaire confirme l'augmentation de la synthèse de VTG ainsi que son incorporation dans l'ovocyte en développement. Une observation surprenante indique que les goujons mâles présents à Wegnez montrent le même effet campagne. Une hypothèse pourrait être un impact d'oestrogènes environnementaux rejoignant la Vesdre dont le débit diminuerait à l'approche de la saison estivale, induisant une moins grande dilution de ces composés, donc une « dose » d'exposition progressivement plus importante et susceptible d'influencer de plus en plus fort la synthèse endogène de VTG chez ces mâles.

Un effet du site a pu être révélé chez les loches femelles à Goffontaine. La VTG mesurée en « aval » est plus faible qu'en amont. Solé *et al.* (2003b) confirment également cette observation. Ils expliquent que cette diminution du taux plasmatique de VTG en aval d'une STEP peut être attribuée à une exposition aux œstrogènes environnementaux. Ceux-ci seraient capables de stimuler les mécanismes de feedback négatif de la sécrétion des gonadotropines et de réduire par conséquent la synthèse de cette lipoprotéine. Une autre voie possible serait la liaison d'un xénoestrogène faible aux récepteurs hépatiques à l'E2 provoquant une plus faible expression du gène de la VTG et donc une diminution de sa synthèse. D'après Kime (1999), une altération des profils de VTG chez les femelles peut fournir un biomarqueur utile de dysfonctionnement de l'axe reproducteur, provoqué par une perturbation.

Chez les goujons mâles à Goffontaine, il existe des variations individuelles fort élevées. De grandes variations de VTG entre carpes communes mâles ont aussi été observées

par Carballo et al. (2005). Il semblerait que cette différence soit due au fait que certains mâles peuvent présenter une induction de VTG alors que d'autres pas. Aucun effet du site n'a donc pu être révélé chez les goujons mâles de même que chez les loches mâles, pour aucune des deux stations. Diverses hypothèses explicatives peuvent être avancées. D'après Cheek et al. (2001), l'absence d'expression de VTG chez les medakas japonais mâles, ne doit pas être interprétée comme une absence de conséquences. En réalité, l'induction de cette lipoprotéine est un effet transitoire ou activationnel, ce qui signifie qu'elle disparaît lorsque le stimulus oestrogénique est retiré. Dès lors l'absence de VTG peut être un « faux » négatif pour des poissons ayant été récemment exposés. De plus, l'induction de la VTG dépend de la dose « reçue » et/ou de la durée de l'exposition. Des expositions à court terme, aux concentrations rencontrées dans l'environnement, n'altèrent pour ainsi dire pas le taux plasmatique en VTG. La sensibilité des espèces aux oestrogènes environnementaux peut influencer l'importance de la réponse vitellogénique. De telles variations de sensibilité entre espèces peuvent être attribuées aux différences dans les taux de stéroïdes circulants et dans l'affinité des récepteurs oestrogéniques. Jobling et Tyler (2003) explique également que si certaines stations d'épuration sont oestrogéniques pour les poissons, d'autres peuvent ne pas l'être suite à une importante dilution de l'effluent au sein de la rivière, ou à des processus d'épuration plus intensifs. Notons que la STEP de Goffontaine est en mesure d'assainir les eaux usées de 30.000 habitants alors que Wegnez possède une capacité de 170.000 équivalent-habitant. Leur fonctionnement est cependant similaire : leur procédé d'épuration principal est basé sur un traitement biologique à « boues activées ». L'élimination des pollutions carbonatées, azotées et phosphorées se réalise par traitement biologique. Toutefois, le phosphore est préalablement éliminé via un processus physicochimique.

5.2.2. L'activité aromatase

L'aromatase augmente chez les loches femelles à Goffontaine entre novembre et fin mai. Sachant que cette enzyme est responsable de la biosynthèse de l'E2 et que ce dernier augmente au cours du cycle de l'ovogenèse afin d'assurer la production de VTG, cette observation semble normale. Pour ces mêmes poissons, un effet du site a été révélé à Wegnez : l'activité aromatase en aval est plus élevée qu'en amont. Cette constatation est pourtant contraire à celle obtenue par Lavado et al. (2004) qui ont observé chez les carpes une activité aromatase plus faible en aval d'une STEP. Ils concluent à la présence d'inhibiteurs de l'activité aromatase (fadrozole, PAHs) dans l'eau de la rivière. Dès lors, dans notre cas, une hypothèse sur la présence d'inducteurs, cette fois, de l'activité aromatase dans la rivière peut être proposée. Rappelons que le contenu des STEP peut varier selon les pays, la région et les modes de vie à ces endroits.

5.2.3. Les stéroïdes sexuels plasmatiques

Chez les goujons femelles, les valeurs d'œstradiol (E2) présentent une grande variabilité individuelle, surtout à Goffontaine. Dès lors aucune différence n'a pu être mise en évidence. Néanmoins les valeurs obtenues (4 à 5,5ng/ml) sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par Pauporté (2004) lors de son travail de fin d'étude (entre 4 et 8ng/ml). A Wegnez, la concentration plasmatique en testostérone (T) est plus élevée en « aval ». Dès lors, le rapport E2/T montre un effet significatif du site et est par conséquent plus faible en aval de Wegnez. Les valeurs de 11-kétotestostérone (11-KT) sont comprises entre 0,22 et 3,17ng/ml et correspondent aux valeurs également obtenues par Pauporté (2004), ces dernières ne dépassant pas 4ng/ml. La 11-KT était plus faible en aval de Wegnez par rapport au site amont. En conséquence, le rapport 11-KT/T est également plus faible en aval de Wegnez.

Pour les goujons mâles, les valeurs obtenues sont aussi importantes que chez femelles. Pauporté (2004) a pourtant montré que chez les goujons mâles, la concentration plasmatique en E2 ne dépasse pas 2ng/ml. Un effet « site » à Goffontaine a pu être révélé, l'E2 étant plus élevé en aval par rapport au site « amont ». La T est aussi du même ordre de grandeur que pour les femelles et aucune différence n'a pu être observée, ni dans le temps, ni dans l'espace. Il semble évident que le rapport E2/T suit l'évolution de la concentration d'E2 puisque aucune différence n'a été détectée pour la T. Ainsi, à Goffontaine, le rapport E2/T est aussi plus élevé en aval. Cette tendance est manifestement contraire à ce qui est observé chez les goujons femelles pour Wegnez. Lavado et al. (2004) confirment l'existence de rapports E2/T élevés chez les carpes mâles vivants dans les eaux polluées proches des STEP. Il mentionne également que le rapport E2/T est souvent utilisé en tant qu'indicateur de perturbation endocrine, un mauvais ratio pouvant résulter en un développement gonadal incomplet ou altéré. La 11-KT présente une variabilité individuelle élevée. A Wegnez, un effet du temps est observable entre fin mars, fin avril, et fin mai, qui consiste en une augmentation de la teneur plasmatique en 11-KT chez les mâles. Un effet « site » à Goffontaine a été détecté pour la 11-KT, l'aval présentant une concentration plus élevée. Dès lors le rapport 11-KT/T suit l'évolution de la 11KT au cours du temps et au travers des sites puisque la T ne montre aucune différence. Ainsi le rapport 11-KT/T augmente au cours du temps à Wegnez et est plus élevé en aval de Goffontaine par rapport au site « amont ». Ces observations sont contraires à celles obtenues par Bjerselius et al. (2001) sur les carassins dorés mâles *Carassius auratus*. Celui-ci explique que des études antérieures réalisées sur les mâles matures de carassin doré et concernant des implants d'E2 réduisent les niveaux plasmatiques en T et 11KT probablement impliqués dans le contrôle du comportement sexuel.

Chez les loches femelles, un effet campagne a été révélé pour Wegnez, l'E2 en fin avril étant plus faible qu'en fin mai. Pour la T, un effet site est visible à Wegnez, l'amont présentant un taux de T plus élevée qu'en aval. Ainsi, comme attendu, le rapport E2/T est plus faible en fin avril à Wegnez par rapport à la fin mai. Cependant, le rapport E2/T révèle aussi une différence dans le temps pour Goffontaine : la campagne de novembre présentant un rapport E2/T plus élevé que pour les trois autres campagnes. La 11-KT présente une variabilité importante et est aussi plus élevée en amont de Goffontaine par rapport au site « aval ». Il en est de même pour Wegnez où la 11-KT est également plus élevée en amont. En plus, pour cette même station de Wegnez, un effet temporel est visible ; une augmentation de la teneur plasmatique en 11-KT est observable entre fin avril et fin mai. Le rapport 11-KT/T présente lui aussi une grande variabilité et pourtant un effet campagne est observable à Wegnez : ceci semble logique au regard de l'évolution temporelle des concentrations en T et 11-KT.

Les loches mâles présentent des concentrations similaires à celles des femelles de la même espèce. Un effet « campagne » est visible à Wegnez, l'E2 étant plus faible en fin avril par rapport à la fin mai. La T varie par contre fortement, notamment à Goffontaine, et ne montre aucun effet. L'effet campagne de Wegnez se reporte donc sur le rapport E2/T qui suit les variations saisonnières de l'E2, la T ne montrant aucune différence. La 11-KT ne varie pas entre les sites et les campagnes. Dès lors, on ne constate pas non plus d'évolution dans le rapport 11-KT/T.

Comme on peut le constater, les stéroïdes ne montrent pas particulièrement de différences entre les sites. Une grande variabilité a souvent été observée parmi les individus. D'ailleurs, Solé et al. (2003b) n'ont pas pu mettre en évidence des différences au niveau des stéroïdes sexuels car, pour l'E2 et la T, les valeurs fluctuaient fortement entre les individus, parmi les stations et les périodes. Ils suggèrent donc que dans des sites modérément pollués, les variations biologiques peuvent masquer d'éventuelles différences dues à l'impact des

polluants chimiques. L'absence de différence pour la plupart des espèces et sexes, peut s'expliquer de plusieurs manières. Le stress de la capture peut modifier les profils endocriniens des poissons. Cependant, les prélèvements ont été réalisés endéans 5 minutes pour minimiser cet effet. Un élément non négligeable concernant l'utilisation des stéroïdes en tant que biomarqueur d'exposition est que des fluctuations peuvent se produire au long du cycle reproducteur. Cela implique que lors d'études comparatives parmi les populations de poissons, ces derniers soient échantillonnés exactement au même moment du cycle. De plus, l'échantillonnage doit se produire au même moment du jour afin d'éviter les rythmes circadiens déjà reportés pour plusieurs espèces (Ankley *et al.*, 1998).

Toutefois il est intéressant de noter que pour les deux espèces, les mâles présentent des valeurs en oestradiol proches, voire identiques à celles des femelles. Contrairement aux résultats obtenus par Pauporté (2004) qui indique que les concentrations en E2 chez les goujons mâles capturés dans d'autres rivières ne dépassait pas 2ng/ml. Une concentration en E2 et un rapport E2/T plus élevés en aval de Goffontaine constituent également des observations très intéressantes puisque Jobling *et al.* (2002) ont observé une augmentation d'oestradiol chez les mâles en aval de STEP. Une altération des niveaux en stéroïdes peut résulter d'effets sur les enzymes stéroïdogéniques ou de modifications indirectes liées à des mécanismes de feedback (Ankley *et al.*, 1998). De plus, la concentration en VTG chez les goujons que nous avons capturés est anormalement élevée. Par contre, chez les goujon mâles d'autres rivières, Pauporté (2004) montre des concentration en VTG deux fois plus faibles que celles obtenues dans notre étude. Il semble dès lors que les goujons mâles possèdent un taux de VTG et d'E2 simultanément plus élevés, indiquant probablement une exposition à des composés oestrogéniques environnementaux. Une hypothèse serait que la rivière en elle-même soit oestrogénique, au moins sur la section étudiée, suite à des effluents diffus non spécifiquement liés à la présence de STEP, masquant de la sorte leur impact possible.

5.2.4. L'activité hépatique EROD

Globalement l'activité EROD présente une différence entre les sexes, l'activité présente chez les mâles étant plus élevée que chez les femelles. Faller *et al.* (2003) confirment d'ailleurs cette différence entre sexes via une étude sur les goujons (suisse) et l'attribue au fonctionnement de leur cycle reproducteur respectif, l'E2 produit chez les femelles inhibant l'activité EROD. De plus l'activité diminue progressivement au cours du temps chez les femelles pour certains sites. Ceci se comprend aisément sachant que l'E2 sécrété par les follicules ovariens et jouant un rôle dans la synthèse hépatique de VTG, inhibe cette activité EROD également présente dans le foie. Les mâles sains n'ayant pas de production interne d'E2, ne sont donc pas concernés par ce phénomène en conditions normales. Des différences entre sites sont aussi observables, l'activité EROD étant globalement plus élevée en aval pour certains sites. Ma *et al.* (2004) confirment cette induction EROD par un effluent de STEP. Chez les mâles, on constate une augmentation de l'activité au cours du temps. Cette tendance saisonnière, en plus de la différence entre sexe a été aussi observée chez les carpes, l'EROD étant plus élevée en été, augmentant parallèlement à la température de l'eau (Solé *et al.*, 2002). Il faut garder en mémoire que l'analyse de l'activité EROD n'a pu être effectuée sur une base statistique et que la prudence est requise dans l'interprétation de ces résultats.

5.3. Aspects méthodologiques de l'étude

Un autre aspect, concernant l'influence possible de la méthodologie appliquée à notre étude, doit être pris en compte. Pour rappel, le cours d'eau étudié, la Vesdre, est une rivière ayant subi de graves pollutions surtout aux alentours de Verviers (ville en amont des deux STEP étudiées) mais qui est en voie de restauration aujourd'hui. Ainsi, l'impact d'une éventuelle pollution généralisée à l'ensemble du cours d'eau ou du moins à la section étudiée, et masquant des différences possibles qui existeraient entre les sites, ne doit pas être négligé dans l'analyse des résultats.

De plus, nous avons choisi d'analyser l'impact éventuel de deux stations d'épuration (STEP) (Wegnez et Goffontaine). Il est vrai que, comme nous l'avons mentionné précédemment, une station d'épuration n'est pas l'autre. Chacune a ses particularités selon sa localisation, son fonctionnement et le type d'eaux usées qu'elle traite. L'analyse de deux stations d'épuration n'est peut être pas suffisante pour révéler un impact général.

Dans la mesure du possible, les lieux de pêches « amont » et « aval » ont été choisis les plus proches possibles du rejet d'effluent de STEP. Cependant, les sites ont dû être sélectionnés aussi en fonction de leur facilité d'accès et praticabilité. Dès lors, les sites « amont » et « aval » se situent jusqu'à au moins 1km de part et d'autre du rejet. Sur cet intervalle, il est possible que d'autres sources mineures de pollutions existent, sachant que les abords de la Vesdre dans cette région sont plus ou moins fortement urbanisés.

En ce qui concerne la fréquence des échantillonnages, rappelons que quatre campagnes ont été effectuées. Les seules différences significatives étaient surtout observées entre les campagnes les plus éloignées dans le temps comme par exemple entre C1 (novembre) et C4 (fin mai). Dès lors, peut être aurait il été intéressant de réaliser moins de campagnes, pour la plupart trop proches dans le temps et ne montrant pas de différences particulières entre elles, mais d'étendre l'analyse à un plus grand nombre de STEP. Aussi, sachant que le débit de la rivière peut être un facteur d'influence important, une campagne hivernale et une autre campagne estivale semblent toutefois nécessaires.

Il est intéressant de discuter du choix des espèces utilisées. Quatre espèces avaient été proposées et échantillonnées, cependant seuls les goujons et les loches étaient répandus sur l'ensemble des sites. Cette aire de répartition large est le paramètre principal qui a déterminé notre choix pour cette étude de terrain. Cependant, quelques inconvénients peuvent aussi masquer l'impact éventuel des STEP. Notamment, les goujons et les loches, seules espèces considérées pour l'interprétation des résultats, sont des poissons de petites tailles. Dès lors, les divers organes et tissus d'intérêt constituent de faibles quantités de matériel biologique, ne permettant pas toujours de réaliser toutes les analyses en laboratoire. Cela a fortement contribué à obtenir ce plan d'échantillonnage incomplet. De plus, il s'agit, pour rappel, d'espèces à courte durée de vie. Or, la durée de l'exposition est un facteur important influençant l'impact de telles pollutions chimiques. Ainsi, il est possible que les STEP soient bien oestrogéniques mais que l'exposition de ces poissons à leurs effluents soit trop courte pour que les effets soient visibles. A notre connaissance, la sensibilité des espèces choisies n'est pas déterminée et/ou aurait dû être vérifiée. Notons qu'il s'agit surtout d'espèces benthiques, et qui, bien qu'exposées à des sédiments contaminés, pourraient se révéler plus tolérantes, peut être suite à une adaptation progressive au cours des générations. Bref, il aurait été intéressant de connaître précisément la sensibilité des goujons et des loches face aux rejets d'effluents de STEP.

A chaque site, nous avons choisi de capturer 10 poissons de chaque espèce : 5 femelles et 5 mâles. Cependant, le dimorphisme sexuel n'étant pas ou très peu visible entre les sexes, et puisque nos pêches électriques ne devaient pas posséder un caractère invasif (capture et sacrifice d'un grand trop nombre de poissons afin d'atteindre le cota fixé), ce plan d'échantillonnage n'a malheureusement pu être respecté pour tous les sites et campagnes (rappel : tableau 4.1.1, partie résultats). Le jeu de données qui en résulte étant incomplet, l'analyse et l'interprétation des résultats peut être influencée.

Cette étude avait pour objectif de déterminer l'impact éventuel de rejets d'effluents de stations d'épuration (STEP) sur le système reproducteur des poissons. Deux stations d'épuration situées sur le cours de la Vesdre ont été étudiées. Il s'agissait des STEP de Wegnez et de Goffontaine pour lesquelles des pêches électriques ont été réalisées en « amont » et en « aval » des rejets. Le goujon, la loche, le chabot, et l'ombre ont été choisis comme espèces pour la détection d'effets oestrogéniques à différents niveaux de l'axe reproducteur. Cependant, le goujon et la loche étant les seules espèces bien représentées pour l'ensemble des sites et des campagnes, les manipulations et analyses ultérieures aux campagnes de pêches n'ont été effectuées que pour ces deux espèces.

Dans l'ensemble, l'analyse des divers paramètres étudiés (RGS, maturation et croissance ovocytaire, atrésie, stade le plus avancé de la spermatogenèse, intersexes, VTG plasmatique, activité aromatase dans les gonades, stéroïdes sexuels plasmatiques, et activité hépatique de détoxification EROD) ne permet pas de mettre en évidence des différences systématiques entre les sites (« amont » et « aval ») pour chacune des espèces, des STEP et des campagnes.

Néanmoins, il est intéressant de noter que pour l'ensemble des sites et des campagnes, les concentrations en oestradiol (E2) présentes chez les goujons mâles sont aussi élevées que chez les femelles. En conséquence, une accumulation de VTG est observée chez les goujons mâles, constatation inhabituelle chez des individus sains. Une oestrogénicité globale de la Vesdre, éventuellement due à des effluents diffus non liés aux STEP, peut constituer une explication plausible même si une tendance similaire n'est pas observée chez les loches mâles. L'absence de différence entre sexes pourrait être expliquée par un taux d'E2 plus faible chez les femelles. Le goujon semble donc être l'espèce la plus sensible à l'état de pollution de la Vesdre.

Un autre argument témoigne d'une altération du système reproducteur par des perturbateurs endocriniens, notamment au niveau des STEP. En effet, pour les loches femelles à Goffontaine, plusieurs paramètres évoluent parallèlement vers l'indication d'une altération du cycle reproducteur : le RGS, le diamètre du stade ovocytaire le plus avancé, et la VTG étaient plus faibles en « aval » de Goffontaine, alors que l'atrésie et l'activité EROD étaient plus élevées.

De plus, bien qu'aucune analyse statistique n'ait été réalisée pour l'activité EROD, cette dernière est toujours plus élevée en « aval » des STEP (quels que soient les sites, espèces et campagnes), indiquant peut être une exposition à divers polluants environnementaux.

L'absence de différences systématiques entre les sites étudiés peut résulter d'un effet masquant induit par la pollution généralisée de la Vesdre. L'étude de stations d'épuration situées sur d'autres rivières beaucoup plus saines pourrait se révéler plus intéressante. Cependant, si l'étude doit être absolument réalisée sur une rivière polluée telle que la Vesdre, la solution serait de placer les poissons dans des bassins en circuits ouverts sur le site de la STEP et de les confronter à diverses dilutions de l'effluent préalablement dévié de son trajet vers la rivière. De cette manière, seul l'impact de l'effluent serait examiné. Ceci permettrait aussi de parer au problème de la trop grande dilution de l'effluent en fonction du débit de la rivière, phénomène empêchant souvent la détection de l'oestrogénicité des STEP. En effet, grâce à un système de vannes, il serait possible d'alimenter les bassins en effluent et en eau propre selon les concentrations désirées. Ceci permettrait de déterminer la concentration à partir de laquelle les effets deviennent visibles. Ce genre d'installation est déjà d'application pour la station d'épuration de la ville de Montréal, Canada.

L'absence de différences pourrait aussi être expliquée par l'importante variabilité observée entre individus. Pour les analyses statistiques, il serait intéressant de regrouper les

individus correspondant au même stade de maturation. Cela permettrait de diminuer la grande variabilité obtenue, en partie due aux profils en stéroïdes, en VTG, pour l'activité aromatase et autres facteurs de la reproduction qui varient au cours du temps, et ne sont pas comparables entre eux pour différents stades de maturation gonadale.

Au niveau des espèces étudiées, leur courte durée de vie (3-4 ans) peut constituer un obstacle à la détection, les effets ne se manifestant qu'après une durée d'exposition plus ou moins longue. Il serait utile d'utiliser des espèces à durée de vie plus longue telles le chevine car elles seraient susceptibles de montrer une réponse plus nette.

La sensibilité des espèces utilisées nous étant inconnue, il nous est impossible de savoir s'il s'agit d'espèces tolérantes ou polluo-sensibles. Rappelons que le goujon et la loche sont des poissons benthiques et donc fortement soumis aux polluants adsorbés sur les sédiments. Cependant, une adaptation progressive de ces espèces pourrait être responsable d'une résistance particulière face à l'exposition aux effluents de STEP. Une étude préalable en laboratoire exposant les espèces à des composés oestrogéniques tels l'œstradiol ou l'éthinyl-oestradiol permettrait de se rendre compte de leur degré de sensibilité.

Un autre problème peut être soulevé : il concerne la mobilité des espèces sauvages. En effet, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que tous les poissons capturés présentent la même durée d'exposition à ces STEP. Certains poissons peuvent avoir migré vers l'endroit du rejet depuis peu de temps, ne montrant dès lors pas de réponse suite à la trop courte durée d'exposition. L'encagement semble constituer une solution à ce problème, empêchant les poissons de se déplacer sur d'autres sections du cours d'eau et permettant ainsi de déterminer ou de choisir la durée exacte de l'exposition.

Les espèces étant de petite taille, les quantités de tissus et d'organes prélevés sont trop petites que pour réaliser toutes les analyses prévues en laboratoire. Ainsi, l'utilisation d'espèces de plus grande taille permettrait de contrer ce problème et d'obtenir un jeu de données beaucoup plus complet que celui rencontré dans cette étude. Cependant, un poisson de trop grande taille peut présenter un désavantage, sachant qu'il sera plus difficile et plus coûteux de le maintenir en laboratoire, lors d'études préalables telles la vérification de la sensibilité.

Les STEP ne sont pas toujours comparables en terme d'impact oestrogénique. Ainsi, l'étude d'un plus grand nombre de STEP permettrait de dégager un impact global des effluents. Peut être serait-il intéressant à l'avenir de réaliser moins de campagnes, mais de consacrer plus de temps à l'échantillonnage de nombreuses STEP. Quoiqu'il en soit, au vu des résultats obtenus pour les divers facteurs d'influence, notre étude ne semble pas montrer de différence générale entre les sites des STEP. Cela ne nous permet pourtant pas d'affirmer que l'effluent ne possède pas d'impact sur le système reproducteur des poissons, divers paramètres non contrôlés étant susceptibles de masquer des effets subtils mais réels à Wegnez et Goffontaine.

Afonso L.O., Campbell P.M., Iwama G.K., Devlin R.H., Donaldson E.M., 1997, The effect of the aromatase inhibitor fadrozole and two polynuclear aromatic hydrocarbons on sex steroid secretion by ovarian follicles of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 106, 2, 169-174.

Aguayo S., Muñoz M.J., de la Torre A., Roset J., de la Peña E., Carballo M., 2004, Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Science of The Total Environment*, 328, 1-3, 69-81.

Ankley G., Mihaich E., Stahl R., Tillitt D., Colborn T., McMaster S., Miller R., Bantle J., Campbell P., Denslow N., Dickerson R., Folmar L., Fry M., Giesy J., Gray L.E., Guiney P., Hutchinson T., Kennedy S., Kramer V., LeBlanc G., Mayes M., Nimrod A., Patino R., Peterson R., Purdy R., Ringer R., Thomas P., Touart L., Van Der Kraak G., Zacharewski T., 1998, Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 1, 68-87.

Arukwe A., Celius T., Walther B.T., Goksøyr A., 2000(a), Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, 49, 3, 159-170.

Arukwe A., Goksøyr A., Thibaut R. and. Cravedi J.P., 2000(b), Metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Environmental Research*, 50, 1-5, 141-145.

Arukwe A., 2001, Cellular and Molecular Responses to Endocrine-Modulators and the Impact on Fish Reproduction, *Marine Pollution Bulletin*, 42, 8, 643-655.

Aubin D., Varone F., 2002, The River Basin Approach in Wallonia. Case Study 1: The Vesdre River Basin, 1980-2001, final report for the EUWARENESS Project, Working Paper of the CSTM: University of Twente, 44p.

Bjerselius R., Lundstedt-Enkel K., Olsén H., Mayer I., Dimberg K., 2001, Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17-estradiol. *Aquatic Toxicology*, 53, 2, 139-152.

Brion F., Tyler C.R., Palazzi X., Laillet B., Porcher J.M., Garric J., Flammarion P., 2004, Impacts of 17-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 68, 3, 193-217.

Carballo M., Aguayo S., de la Torre A., Muñoz M.J., 2005, Plasma vitellogenin levels and gonadal morphology of wild carp (*Cyprinus carpio* L.) in a receiving rivers downstream of Sewage Treatment Plants. *Science of The Total Environment*, 341, 1-3, 71-79.

Cheek A.O., Brouwer T.H., Carroll S., Manning S., McLachlan J.A., Brouwer M., 2001, Experimental evaluation of vitellogenin as a predictive biomarker for reproductive disruption. *Environmental health perspectives*, 109, 7, 681-690.

- Coldham N.G., Sivapathasundaram S., Dave M., Ashfield L.A., Pottinger T.G., Goodall C., Sauer M.J.**, 1998, Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Drug. Metab. Dispos.*, 26, 4, 347-54.
- Crain, D.A., Guillette L.J.Jr.**, 1997, Endocrine-disrupting contaminants and reproduction in vertebrate wildlife. *Reviews in Toxicology*, 1, 47-70.
- Cravedi J.P., Boudry G., Baradat M., Rao D., Debrauwer L.**, 2001, Metabolic fate of 2,4-dichloroaniline, prochloraz and nonylphenol diethoxylate in rainbow trout: a comparative in vivo/in vitro approach. *Aquatic Toxicology*, 53, 3-4, 159-172.
- Devlin R.H., Nagahama Y.**, 2002, Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208, 3-4, 191-364.
- Faller P., Kobler B., Peter A., Sumpter J.P., Burkhardt-Holm P.**, 2003, Stress status of gudgeon (*Gobio gobio*) from rivers in Switzerland with and without input of sewage treatment plant effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 9, 2063-2072.
- Fent K.**, 2004, Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205, 3, 223-240.
- Flammarion P., Devaux A., Nehls S., Migeon B., Noury P., Garric J.**, 2002, Multibiomarker Responses in Fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51, 2, 145-153
- Gomes R.L., Scrimshaw M.D., Lester J.N.**, 2003, Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 10, November, 697-707.
- Halm S., Pounds N., Maddix S., Rand-Weaver M., Sumpter J.P., Hutchinson T.H., Tyler C.R.**, 2002, Exposure to exogenous 17-oestradiol disrupts P450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 60, 3-4, 285-299.
- Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Routledge E.J., Rycroft R., Sumpter J.P., Tylor T.**, 1996, A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 11, 1993-2002.
- Hassanin A., Kuwahara S., Nurhidayat, Tsukamoto Y, Ogawa K, Hiramatsu K, Sasaki F.**, 2002, Gonadosomatic index and testis morphology of common carp (*Cyprinus carpio*) in rivers contaminated with estrogenic chemicals. *J. Vet. Med. Sci.*, 64, 10, 921-926.
- Huang C.H., Sedlak D.L.**, 2001, Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 1, 133-139.
- IEH**, 1999, IEH Assessment on the ecological significance of endocrine disruption: Effects on reproductive function and consequences for natural populations. (Assessment A4), Leicester, UK, MRC Institute for Environment and Health.

- Indarto D., Izawa M.**, 2001, Steroid hormones and endocrine disruptors: recent advances in receptor-mediated actions. *Yonago Acta Medica*, 44, 1-6.
- Jobling S., Sumpter J.P.**, 1993, Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27, 3-4, 361-372.
- Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G., Sumpter J.P.**, 1998, Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology*, 32, 17, 2498-2506.
- Jobling S., Beresford N., Nolan M., Rodgers-Gray T., Brighty G.C., Sumpter J.P., Tyler C.R.**, 2002, Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol. Reprod.*, 66, 2, 272-281.
- Jobling S., Tyler C.R.**, 2003, Endocrine disruption in wild freshwater fish. *Pure Appl. Chem.*, 75, 11-12, 2219-2234.
- Kang I.J., Yokota H., Oshima Y., Tsuruda Y., Yamaguchi T., Maeda M., Imada N., Tadokoro H., Honjo T.**, 2002, Effect of 17-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 47, 1, 71-80.
- Kawai S., Kobayashi M., Kaneko H.**, 2003, Effects of endocrine active substances in wildlife species: Genetic, biochemical, and physiological factors in variable susceptibility to endocrine disruptors. *Pure Appl. Chem.*, 75, 11-12, 2335-2341.
- Kestemont P.**, 1987, Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 1. Variations saisonnières dans l'histologie de l'ovaire. *Sonderdruck aus Journal of Applied Ichthyology*, 3, 4 ; 145-157.
- Kestemont P.**, 1989, Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 2. Variations saisonnières dans l'histologie des testicules. *J. Appl. Ichtyol.*, 5, 111-121.
- Kestemont P.**, 1990, Dynamic aspects of ovogenesis in an asynchronous fish, the gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae), under controlled temperature and photoperiod conditions. *Aquat. Living Resour.*, 3, 61-74.
- Kime D.E.**, 1999, A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction, *The Science of The Total Environment*, 225, 1-2, 3-11.
- Kime D.E., Nash J.P.**, 1999, Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *The Science of The Total Environment*, 233, 1-3, 123-129.
- Lam P.K.S., Gray J.S.**, 2003, The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 2, 182-186.
- Lavado R., Thibat R., Raldua D., Martin R., Porte C.**, 2004, First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro river. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, 247-257.

- Leino R.L., Jensen K.M., Ankley G.T.,** 2005, Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 1, 85-98.
- Lye C.M., Frid C.L.J., Gill M.E., McCormick D.,** 1997, Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Marine Pollution Bulletin*, 34, 1, 34-41.
- Ma T., Wan X., Huang Q., Wang Z., Liu J.,** 2005, Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 59, 281-288.
- Ministère des travaux publics, administration des voies hydrauliques,** 1987, zones inondables: Bassin de la Vesdre. Rapport 4b. 4.
- Monteiro P.R.R., Reis-Henriques M.A., J. Coimbra,** 2000, Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology*, 48, 4, 549-559.
- Nagahama Y.,** 1997, 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, 62,1,190-196.
- Nakada N., Nyunoya H., Nakamura M., Hara A., Iguchi T., Takada H.,** 2004, Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 12, 2807-2815.
- Neubert D.,** 1997, Vulnerability of the Endocrine System to Xenobiotic Influence', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 26,1, 9-29.
- Noaksson E., Linderöth M., Gustavsson B., Zebühr Y., Balk L.,** 2004, Reproductive status in female perch (*Perca fluviatilis*) outside a sewage treatment plant processing leachate from a refuse dump. *Science of the total environment*. Article in press.
- Örn S., Holbech H., Madsen T.H., Norrgren L., Petersen G.I.,** 2003, Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology*, 65, 4, 397-411.
- Ostrander G.K.,** 2000, The Laboratory Fish (CD-ROM), Academic Press, San Diego, CA.
- Pait, A.S., Nelson J.O.,** 2002, Endocrine Disruption in fish: Assessment of Recent Research and Results. NOAA Tech. Memo. NOS NCCOS CCMA 149. Silver Spring, MD:NOAA, NOS, Center for Coastal Monitoring and Assessment, 55p.
- Panter G.H., Thompson R.S., Sumpter J.P.,** 1998, Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquatic Toxicology*, 42, 4, 243-253.
- Pauporté D,** 2004, Influence des xénobiotiques sur la reproduction du goujon *Gobio gobio* en rivière. Recherche de biomarqueurs d'exposition. *Mémoire de licence, URBO, FUNDP*, 57p

Pawlowski S., Sauer A., Shears J.A., Tyler C.R., Braunbeck T., 2004, Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*, 68, 3, 277-291.

Perrin, 2001, in Keith P., Allardi J., 2001, Atlas des poissons d'eau douce de France. *Paris: Muséum national d'histoire naturelle. Institut d'écologie et de gestion de la biodiversité.*

Persat, 2001, in Keith P., Allardi J., 2001, Atlas des poissons d'eau douce de France. *Paris: Muséum national d'histoire naturelle. Institut d'écologie et de gestion de la biodiversité.*

Phillipart J.C., Neus Y., Nzau Matondo B., Ovidio M., Rimbaud G., 2003, Evolution de 1970 à 2003 de la faune des poissons dans la Vesdre en cours d'épuration. Eléments pour un plan de restauration écologique et piscicole globale du bassin. *Rapport d'étude au fonds piscicole de Wallonie (commission provincial de Liège), LDPH-ULg, 52pp.*

Phillipart J.C., 2004, De jeunes saumons vivent dans la Vesdre à Nessonveaux. LDPH-ULg.

Pickford K.A., Thomas-Jones R.E., Wheals B., Tyler C.R., Sumpter J.P., 2003, Route of exposure affects the oestrogenic response of fish to 4-tert-nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, 65, 3, 267-279.

Porter C.M., Janz D.M., 2003, Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 2, 199-206.

Rinchar J., Kestemont P., Kühn E.R., Fostier A., 1993, Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish the gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae). *General and comparative endocrinology*, 92, 168-178.

Rinchar J., Kestemont P., Heine R., 1996, Comparative study of reproductive biology in single and multiple-spawner cyprinid fish. 1. Morphological and histological features. *Journal of Fish Biology*, 49, 1, 883-894.

Rinchar J., Kestemont P., Heine R., 1997, Comparative study of reproductive biology in single and multiple-spawner cyprinid fish. 2. Sex steroid and plasma protein phosphorus concentrations. *Journal of Fish Biology*, 50, 1, 169-180.

Rinchar J., Poncin P., Kestemont P., 1998, Croissance ovocytaire et régulation stéroïdienne chez les poissons à pontes uniques et multiples: une revue. *Annls. Limnol.*, 34, 2, 211-225.

Rosecchi, Kestemont, 2001, in Keith P., Allardi J., 2001, Atlas des poissons d'eau douce de France. *Paris: Muséum national d'histoire naturelle. Institut d'écologie et de gestion de la biodiversité.*

Schoenfuss H.L., Levitt J.T., Van der Kraak G., Sorensen P.W., 2002, Ten-week exposure to treated sewage discharge has relatively minor, variable effects on reproductive behavior and sperm production in goldfish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 10, 2185-2190.

- Scholz S., Gutzeit H.O.,** 2000, 17 α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 50, 4, 363-373.
- Smith A.K., Ajani P.A., Roberts D.E.,** 1999, Spatial and temporal variation in fish assemblages exposed to sewage and implications for management. *Marine Environmental Research*, 47, 3, 241-260.
- Solé M., Porte C., Barceló D.,** 2001, Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker. *Trends in Analytical Chemistry*, 20, 9, 518-525.
- Solé M., Barceló D., Porte C.,** 2002, Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquatic Toxicology*, 60, 3-4, 233-248.
- Solé M., Raldúa D., Piferrer F., Barceló D., Porte C.,** 2003(a), Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136, 2, 145-156.
- Solé M., Raldúa D., Barceló D., Porte C.,** 2003(b), Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 3, 373-380.
- Sonnenschein C., Soto A.M.,** 1998, An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 65, 1-6, 143-150.
- Sumpter J.P.,** 1995, Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters*, 82-83, 737-742.
- Sumpter, J.P., Jobling S.,** 1995, Vitellogenin as a biomarker of exposure to oestrogens. *Environmental Health Perspectives*, 103, 6, 173-178.
- Taylor M.R., Holmes P., Duarte-Davidson R., Humfrey C.D.N., Harrison P.T.C.,** 1999, A research strategy for investigating the ecological significance of endocrine disruption: report of a UK workshop. *The Science of The Total Environment*, 233, 1-3, 181-191.
- Tollefsen K-E.,** 2002, Interaction of estrogen mimics, singly and in combination, with plasma sex steroid-binding proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 56, 3, 215-225.
- Van Aerle R., Nolan M., Jobling S., Christiansen L.B., Sumpter J.P., and Tayler C.R.,** 2001, Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in united kingdom freshwaters. *Environmental Toxicology and chemistry*, 20, 12, 2841-2847.
- Van der Kraak G., Zacharewski T., Janz D. M., Sanders B. M., Gooch J. W.,** 1998, Chapter 5: Comparative endocrinology and mechanisms of endocrine modulation in fish and wildlife. *Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruption in Wildlife*. SETAC press. 97-111.

van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E., 2003, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 2, 57-149.

Vasseur P., Cossu-Leguille C., 2003, Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International*, 28, 8, 711-717.

Ying G., Williams B., Kookana R., 2002(a), Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environment International*, 28, 3, 215-226.

Ying G., Kookana R.S., Ru Y., 2002(b), Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, 28, 6, 545-551.

Vorapongsathorn T., Taejaroenkul S., Viawatwongkasem C., 2004, A comparison of a type I error and power of Bartlett's test, Levene's test and Cochran's test under violation of assumptions. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26, 4, 537-547.

